

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Bioquímica



EFFECTO DEL TAUOURSODEOXICOLATO EN LA REGULACIÓN DE LA NEUROINFLAMACIÓN AGUDA

TESIS DOCTORAL

Natalia Yanguas Casás

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Bioquímica



**EFFECTO DEL
TAUOURSODEOXICOLATO
EN LA REGULACIÓN DE LA
NEUROINFLAMACIÓN AGUDA**

TESIS DOCTORAL

Natalia Yanguas Casás

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Bioquímica

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Instituto Cajal

EFFECTO DEL TAUROURSODEOXYCOLATO EN LA REGULACIÓN DE LA NEUROINFLAMACIÓN AGUDA

Memoria presentada por Natalia Yanguas Casás para optar al título de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid (UAM) en el Programa de Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular, Biomedicina y Biotecnología, de acuerdo al trabajo realizado bajo la dirección del Dr. Lorenzo Romero Ramírez y el Prof. Manuel Nieto Sampedro en el Dpto. de Neurobiología Funcional y de sistemas del Instituto Cajal (CSIC).

A vosotros,

A mí,

“Why, sometimes I’ve believed as many as six impossible things before breakfast.”

(Porque, algunas veces, he imaginado hasta seis cosas imposibles antes del
desayuno)

— Lewis Carroll, *Alice in Wonderland*

“It would be so nice if something made sense for a change”

(“Sería tan agradable que algo tuviera sentido, para variar”)

— Lewis Carroll, *Alice in Wonderland*

AGRADECIMIENTOS

Qué bonito es dar las gracias cuando se sienten de verdad. Y es que esta tesis que estáis a puntito de leer no sería posible sin todas y cada una de las personas que vienen a continuación (y algunas más). Dicen que lo más bonito que te puede regalar alguien es su tiempo, porque es lo único que no pueden recuperar. A todos, gracias.

En primer lugar, como corresponde y no podía ser de otra manera, quiero dar las gracias a mis directores de tesis Lorenzo y Manuel, por darme esta oportunidad tan extraordinaria. Estoy segura de que no tenía nada especial que me diferenciara de otros candidatos, y sin embargo decidieron escogermme a mí, sin conocerme absolutamente de nada, y por ello les estaré eternamente agradecida. Gracias por haber tenido una idea tan buena, gracias por dejarme hacer lo imposible por que funcionara, gracias por darme alas y por las incontables horas de divagaciones de hacia dónde nos llevaba todo. Gracias Manuel, por enseñarme que la ilusión por la ciencia no sólo no se pierde sino que aumenta con el tiempo, y que las únicas barreras que existen para llegar al quid de la cuestión son mentales, no físicas. Gracias en especial a Lorenzo, porque eres el mejor mentor que se puede tener. He aprendido mucho de ti y te admiro profundamente, creo que eres uno de esos raros genios que hay en ciencia, pero eso no te ha impedido enseñarme, escuchar mis ideas y ponerme los pies en la Tierra cada vez que mis ideas felices tenían más de feliz que de idea. Gracias por hacerme pensar. Gracias a Asun, por tu infinita paciencia (sobre todo en mis inicios), por escribirme un diario de a bordo cuando estuve de estancia para que no me perdiera nada, por las horas de quirófano compartidas, las tardes de música a tope cuando se iban los jefes (o no). Gracias por ser mi compañera de experiencia. A Estela, por entrar en el B-21 con muchísimas ganas de aprender y aún más entusiasmo. Te echamos de menos. A Gabi, porque a pesar de no ser estrictamente un miembro del labo eres una más.

A Husus. Porque gracias a ti he hecho cosas increíbles: he abrazado un lince, me he bañado con tiburones, he acampado en mitad de la sabana, he caminado por glaciares, he aprendido a esquiar, he conocido Madrid y tengo un hogar, entre otros miles de cosas. Esta tesis no sería posible sin ti, porque si no existieras jamás me habría planteado venir a Madrid. Gracias por darme alas, por hacer posible lo imposible, por dejarme vivir mis sueños, por no presionarme, gracias por hacerme feliz. A tus aitas, por no hacerme sentir nunca como una extraña en vuestra casa, por compartir su pasión por el monte conmigo y sobre todo por haber hecho de ti el hombre que eres. A Edu, por hacer de hermano cuando el mío no llega.

A mi niña, Miriam Mecha, porque si no te hubiera encontrado me habría perdido. Es curioso cómo el destino nos pone en el camino a personas que cambian nuestra vida para que vuelva a ser nuestra. Gracias por ser simplemente tú, y no dejar que nada te cambie. Gracias por llenar mi vida de música, de viajes, de pájaros, de ideas, gracias por hacerme brillar. Pero sobre todo gracias por ser mi amiga. Gracias a la madre que te parió, Teresa, por ser tan adorable, y porque alguien tan sumamente especial como tú sólo podía provenir de alguien tan increíble como ella.

A Fran, mi pseudo-hermano-pequeño-adoptivo. Gracias por darme cañita, por tus risas tontas, por hacerme partícipe de momentos muy importantes de tu vida, por no tener filtro y por ser capaz de hacer cualquier cosa con tal de hacerme reír. A Zaira, por ser partícipe de nuestras locuras y disfrutarlas, por los viajes que hemos hecho y los que nos quedan por hacer.

A Ana Feliú. Estaba claro que en mi vida en Madrid tenía que aparecer una Anita, pero nada hacía presagiar que fuera a ser tan sumamente especial. Gracias por tu frescura, por tus detalles, por tu risa, por venir con Mecha a buscarme al aeropuerto con un cartel gigante a mi vuelta de la estancia. Gracias por ser tú. A David, por hacer magia, porque me sigue alucinando que pueda existir tanta creatividad concentrada en una sola persona. Gracias, artista, porque a personas como tú debemos nuestros sueños.

A Carmen Guaza, por ser una persona sumamente entrañable y desinteresada y por soportar con una paciencia infinita nuestras charlas interminables al otro lado del cristal.

A Amaia y Fernando, por meterme el gusanillo por la neurociencia y regalarme mis primeras inmunos de microglía.

A mis ángeles, Àngel y Àngel, tan diferentes pero tan importantes para mí. Sois mi ying y mi yang. La cordura y el orden y la locura e indecisión personificadas. Pero tenéis algo en común: todo lo hacéis con una ilusión y una pasión desmedidas. Ha habido un antes y un después de vosotros. Gracias por formar parte de mi vida dentro y fuera del Cajal.

A Julián, mi físico, musikari y bailarín de claqué favorito, por enseñarme a mover los pies como es debido en mitad de Times Square, por tu entusiasmo, tu alegría contagiosa y tu sinceridad. Eres único. No cambies.

A Laura, por apuntarte a un bombardeo, por tus dulces, por tu risa fácil, por tus ganas. Gracias por haber aparecido en nuestras vidas.

A Merce y Jaime, por venir en pack, ya no os concibo por separado ☺ Gracias por grandes momentos como “esto es Ibiza”, “eres mala copa”, morreos con travelos y otros grandes éxitos. Sois la bomba.

A Andrea, por los piñazos compartidos en la nieve aprendiendo a esquiar, y por superar tus vergüenzas y atreverte a dar una charla y a pasear disfrazada por Nueva York. Gracias por mantener la cordura por muy surrealista que se vuelva la situación.

A Rebe, por estar siempre ahí, incluso cuando no estamos. Gracias por hacer que el tiempo sea un continuo en el que los espacios no existen.

A mis niñas: Carol, Loli, Patri y Roci. Por una vida compartida, por aceptarme como soy y por hacerme hablar como las personas normales y dejar de decir palabros raros. Gracias por no dejar que el tiempo cambie vuestra esencia.

A mis ahizpis pegadas, Anita y Meri. ¿Quién nos iba a decir que yo iba a acabar en los madriles alejada de vosotras, con lo que me gusta Bilbo? ¿Y que Lucas aparecería en nuestras vidas el mismo año que la tesis? ¿Y que se iba a llamar Asier? Gracias por adoptarme, por nuestras locuras vividas y por las que nos quedan por hacer.

A todos aquellos que han pasado alguna vez por la Asociación Con/Ciencia, porque nos une la ilusión que tenemos por la ciencia, por ser unos niños grandes con muchísimas ganas de aprender y compartir lo que saben con el mundo. Y gracias a todos aquellos que habéis contribuido a que esto sea posible viniendo a las actividades que organizamos, en especial a las familias de los concienzudos, ha sido un placer conocerlos.

Gracias a Cris A y Carmelo por ser unos incondicionales, por estar siempre ahí apoyándome independientemente del escenario. Al resto del grupo, Luis, Cris I, Nadia, Sara, Carlos, Elenita, Dani, Mireya... ¡y los pegados! Porque nos lo hemos pasado divinamente hasta ahora y quedan muchos viajes por hacer. Porque nunca perdéis la ilusión a pesar de lo duros que pueden llegar a ser vuestros trabajos.

A los miembros del Gistau Team, por hacer que la distancia entre 5 países sea directamente proporcional a un wasap, por los ánimos para escribir la tesis, por no perder el contacto y por la celebración que tenemos pendiente.

A Inés, primero por descubrirme la maravillosa C/ Cardenal Cisneros, y después por haberte convertido en una gran amiga, muy a tu pesar. Gracias por ser tan renegona, tan divertida, por ser una gran profesional y no dejar que nadie te haga dudar de ello.

To the vonTurkovichs, specially Michele, Ana, Brani and Eddie. Thank you so much for taking me in as a family member, thanks for showing me Vermont, its nightlife, its breweries, wine shops, restaurants, the Farmer's Market... It would have been a totally different experience if it weren't for you... You're awesome. From the bottom of my heart: Thank you!

A aquellos con los que he coincidido en el Cajal, y habéis marcado un antes y un después: Mónica (tenemos pendiente una visitilla), Edu (sigue sin haber tensión sexual en el Cajal), Wolfi (seguimos custodiando tu rata), Irene (y tus abrazos inigualables), Ana María, Çagla, Vane, las Evas, Carlos, Vilma, Jesús, Leire, Checho, Raquel, César, Estefanía, Isa, Andrea, Rober, Elsa... a todos los compañeros del Instituto, por saludar siempre con una sonrisa, a Aurelio (por preocuparse tanto), a Carmen y Belén (por las fotazas de confocal), a Laude y todos los del animalario (Mario, Miriam...) por cuidar tan bien de nuestros bichitos, a Fide (por vigilarlo todo para que los cultivos vayan bien), a Pepa, Yago y los de administración (por ayudarme siempre con todos los papeleos)... a todos aquellos que hacen que el Cajal funcione.

A mi familia. A mis padres por el esfuerzo que han tenido que hacer para que yo pudiera estudiar. A mi aita, por enseñarme que nadie regala nada, y que sin esfuerzo no hay recompensa, pero que si me caigo estará ahí para ayudarme a levantarme. A mi ama, por esforzarse siempre en ofrecer lo mejor de sí misma a todo el mundo, por ser más fuerte de lo que ella misma es capaz de ver, y por preocuparse tanto. A mi hermano, porque se le llena la boca de orgullo cuando habla de lo que hace su hermana, y por intentar entenderlo, por ser incondicional y apoyarme hasta en las situaciones más absurdas. A mi abuelo Jesús por enseñarme lo que es el trabajo duro. A mi tío Satur, por hacerme ver que la importancia de una profesión no va dada por el tiempo que te ocupa ni por la remuneración que tenga, sino por el bien que haga. A mi abuela Pili, por enseñarme la belleza de las artes desde pequeña. A mi abuelo Antonio y a mi tío Toñín, por cuidarme desde el cielo. Y a mi abuela Hermosinda, por creer **siempre** en mí.

Después de esta parrafada, y sin más dilación, como dijo un gran hombre una vez: "¡Sáca el látigo! Que vamos a hacer de este jueves un viernes de pasión". Disfrutadla.

“Would you tell me, please, which way I ought to go from here?”
‘That depends a good deal on where you want to get to,’ said the Cat.
‘I don’t much care where -’ said Alice.
‘Then it doesn’t matter which way you go,’ said the Cat.
‘- so long as I get SOMEWHERE,’ Alice added as an explanation.
‘Oh, you’re sure to do that,’ said the Cat, ‘if you only walk long enough.’”

(‘Podría decirme, por favor, ¿qué camino debería tomar desde aquí?’
‘Eso depende en gran medida de dónde quieras llegar’- dijo el Gato.
‘No me importa demasiado dónde’ – dijo Alicia.
‘Entonces no importa qué camino tomes’ – dijo el Gato.
‘Siempre que llegue a ALGÚN LUGAR’ – explicó Alicia.
‘Oh, seguro que lo harás’, dijo el Gato, ‘tan sólo tienes que caminar lo suficiente.’)

— **Lewis Carroll, *Alice in Wonderland***

RESUMEN

El mantenimiento de la homeostasis en el SNC es básico para un correcto funcionamiento del sistema. La BHE limita el paso de sustancias de la sangre al parénquima nervioso. Las células residentes, en especial la microglía y los astrocitos, vigilan continuamente el SNC y responden a cualquier alteración del equilibrio homeostático, ya sea por una infección, lesión traumática u otra perturbación del medio, activándose y desencadenando un proceso de neuroinflamación aguda. La inflamación desaparece una vez que la amenaza ha sido eliminada y se ha restaurado la homeostasis. Sin embargo, si la homeostasis no se recupera, la neuroinflamación puede degenerar en un estado crónico, que va acompañado por una activación exacerbada de astrocitos y microglía. Ambos liberan mediadores inflamatorios y alteran la permeabilidad de la BHE favoreciendo la invasión del SNC por células inmunes del torrente sanguíneo (linfocitos y monocitos) al SNC, lo que puede dañar el tejido y producir muerte celular.

Las sales biliares son herramientas terapéuticas muy interesantes. Son compuestos que produce nuestro organismo de manera natural, atraviesan la BHE y su uso terapéutico está aprobado por la FDA. El efecto neuroprotector y de reducción de la inflamación de estas sales había sido descrito previamente en líneas celulares de microglía, pero su efecto no se había estudiado en células gliales primarias. Por ello, decidimos estudiar el efecto de la sal biliar TUDCA sobre la activación de microglía y astrocitos, en un modelo de neuroinflamación aguda y en diferentes modelos *in vitro*.

El TUDCA podría ser una terapia beneficiosa para patologías que cursan con neuroinflamación, ya que los resultados muestran que se une al receptor GPBAR1/TGR5 en microglía y astrocitos, activando la cascada de AMPc. Esto, a su vez, inhibe la respuesta proinflamatoria de los dos tipos gliales reduciendo la activación de la vía de NFκB inducida por LPS. El TUDCA, además, reduce el infiltrado celular en la zona afectada limitando la capacidad migratoria de la microglía y la entrada de células periféricas. Asimismo, favorece un entorno antiinflamatorio promoviendo un cambio en el fenotipo de la microglía hacia un fenotipo M2 y activando la vía de TGFβ. Por último, en un modelo *in vitro*, el TUDCA protege de la muerte neuronal por contacto directo célula-célula con la microglía reactiva.

ABSTRACT

Maintenance of CNS homeostasis is essential for the correct system function. The Blood Brain Barrier (BBB) limits the infiltration into the neural parenchyma of blood cells and substances. Resident cells, particularly microglia and astrocytes, continuously scan the CNS and can rapidly respond to any variation in the homeostatic balance (caused by an infection, trauma or others) by turning on the reactive state and starting an acute neuroinflammatory process. Acute neuroinflammation stops once the insult has been removed, and homeostasis is restored. However, when homeostasis is not restored, exacerbated activation of microglia and astrocytes, and neuroinflammation may become chronic. The reactive cells release inflammatory mediators that disrupt the BBB permeability, favouring the migration of immune cells (lymphocytes and monocytes) into the CNS, which can cause cell death and damage the CNS tissue.

Bile acids are very interesting therapeutic tools, because they are synthesized by the human body, they can cross the BBB and their therapeutic use is approved by the FDA. The neuroprotective effect of bile acids and their anti-inflammatory effect on microglial cell lines have been described previously. However, their effect on primary glial cells remained unknown. We undertook a study of the effect of a biliary salt, named TUDCA, on an acute model of neuroinflammation and on several *in vitro* models of microglia and astrocyte activation.

TUDCA could be a beneficial therapy for neuroinflammatory diseases. We found that it binds to GPBAR1/TGR5 receptor in microglia and astrocytes, activating cAMP cascade. It inhibited the proinflammatory response in both glial types by inhibiting the NF κ B activation induced by LPS. Besides, it decreased cell infiltration in the injured area both by limiting the microglial migratory capacity and the entrance of peripheral cells into the CNS tissue. TUDCA also brought about an anti-inflammatory environment by promoting a switch in the microglial phenotype towards a M2 phenotype and activating the TGF β pathway. Lastly, *in vitro*, TUDCA inhibited the neuronal cell death caused by reactive microglia through in.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	9
RESUMEN	15
ABSTRACT	17
ÍNDICE	19
ABREVIATURAS	23
INTRODUCCIÓN	29
1- El proceso inflamatorio en el Sistema Nervioso	31
2- Modelo de neuroinflamación por inyección icv de LPS	32
3- Moléculas moduladoras del ambiente proinflamatorio	34
3.1- El AMPc	35
3.2- La familia de la citoquina TGF β	35
4- Importancia de las células gliales en el proceso neuroinflamatorio	36
4.1- Microglía	37
4.2- Astrocitos	41
5- Células del sistema inmune	42
6- Estrategias de control de la neuroinflamación: las sales biliares	44
7- El receptor de las sales biliares	45
OBJETIVOS	50
MATERIAL Y MÉTODOS EXPERIMENTALES	53
1. Material	55
1.1. Animales	55
1.2. Reactivos	55
1.2.1. Para tratamientos <i>in vivo</i>	55
1.2.2. Para la detección de bioluminiscencia	55
1.2.3. Para cultivos celulares	55
1.2.4. Para tratamientos <i>in vitro</i>	56
1.2.5. Para inmunocitoquímica e inmunohistoquímica	56
1.2.6. Para el procesamiento del tejido	57
1.2.7. Para ensayos <i>in vitro</i>	57

1.2.8.	Para la inmunodetección por separación electroforética de proteínas (Western Blot)	57
1.2.9.	Para la extracción de ARN, transcripción inversa (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	57
1.2.10.	Para la transfección de plásmidos reporteros	58
1.3.	Equipos	58
1.4.	Anticuerpos	59
1.5.	Cebadores para PCR cuantitativa	61
1.6.	Plásmidos reporteros	64
2.	Métodos Experimentales	64
2.1.	Animales	64
2.1.1.	Inyección intracerebroventricular de LPS	66
2.1.2.	Inyección intravenosa de LPS	66
2.1.3.	Tratamientos con la sal biliar TUDCA <i>in vivo</i>	66
2.1.4.	Detección de la bioluminiscencia en los ratones SBE/Tk-Luc	66
2.1.5.	Procesado del tejido	67
2.1.6.	Inmunohistoquímica	67
2.1.7.	Extracción de ARNm de hipocampos	68
2.2.	Cultivos primarios de células gliales	68
2.2.1.	Preparación de cultivos primarios de microglía	68
2.2.2.	Preparación de cultivos primarios de astrocitos	69
2.2.3.	Inmunocitoquímica	69
2.2.4.	Determinación de la producción de nitritos.	70
2.2.5.	Ensayos de viabilidad celular	70
2.2.6.	Ensayos de proliferación de microglía	70
2.2.7.	Determinación de los niveles de AMPc	70
2.2.8.	Determinación de la secreción de citoquinas	70
2.2.9.	Estudio de la capacidad migratoria de la microglía	71
2.3.	Cultivos primarios de neuronas	72
2.3.1.	Cocultivos de microglía y neuronas	72
2.3.2.	Transwells de microglía y neuronas	72

2.4. Técnica de inmunodetección por separación electroforética de proteínas (Western Blot)	73
2.5. Estudios de expresión génica por PCR cuantitativa (qPCR)	74
2.5.1. Extracción de ARNm	74
2.5.2. Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	74
2.6. Transfección transitoria de plásmidos reporteros	74
2.6.1. Transfección de plásmidos reporteros en microglía	74
2.6.2. Transfección de plásmidos reporteros en astrocitos	75
2.6.3. Silenciamiento del receptor GPBAR1/TGR5 en células microgliales	75
2.6.4. Estudio de la expresión génica en microglía tras el silenciamiento del receptor GPBAR1/TGR5	76
2.7. Obtención de linfocitos y monocitos	76
2.7.1. Extracción de linfocitos y monocitos de nódulos linfáticos cervicales y cerebro en animales tratados durante 1 día	76
2.7.2. Inmunocitoquímica para la caracterización de poblaciones celulares por citometría de flujo (FACS)	76
2.8. Microscopía óptica y confocal	77
2.9. Análisis estadístico	77
RESULTADOS	79
1. Efecto del TUDCA sobre la neuroinflamación	81
1.1. Efecto del TUDCA en la activación de la ruta proinflamatoria	81
1.2. Efecto del TUDCA sobre la gliosis en ratones inyectados con LPS	87
2. Efecto del TUDCA en el fenotipo microglial	93
2.1. En el hipocampo de los ratones inyectados icv con LPS, el TUDCA aumenta la microglía tipo M2 y reduce la células M1	93
2.2. Caracterización de marcadores de fenotipos M1 y M2 mediante expresión de ARNm en hipocampo de ratón	95
2.3. Efecto del TUDCA en el fenotipo microglial <i>in vitro</i>	96
2.4. Efecto del TUDCA en la supervivencia neuronal <i>in vitro</i>	103

3.	Efecto del TUDCA en la respuesta inmune	105
3.1.	Expresión de ARNm en hipocampos de ratón	105
3.2.	Linfocitos	105
4.	Evaluación del efecto del tratamiento con TUDCA en la vía del TGFβ	107
4.1.	Activación de la vía del TGF β en ratones transgénicos SBE/Tk-Luc	107
4.2.	Caracterización de los isotipos de TGF β implicados	109
5.	Modo de acción del TUDCA	112
5.1.	El TUDCA incrementa los niveles de AMPc en la microglía en cultivo	112
5.2.	Papel del AMPc en la inducción del fenotipo microglial <i>in vitro</i>	112
5.3.	Identificación del receptor del TUDCA	114
5.4.	Efecto funcional de la reducción del receptor mediante siARNs comerciales	116
	DISCUSIÓN	123
	CONCLUSIONES	143
	CONCLUSIONS	147
	REFERENCIAS	149
	Anexo 1: Artículo original: Tauroursodeoxycholic acid reduces glial cell activation in an animal model of neuroinflammation. Publicado en Journal of Neuroinflammation.	169
	Anexo 2: Otras aportaciones científicas de la doctoranda	185

ABREVIATURAS

AMPc	Adenosin Monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de la varianza (del inglés, <i>ANalysis Of VAriance</i>)
Arg1	Arginasa 1
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ATF1	Factor de transcripción dependiente de AMPc 1 (del inglés, <i>Activating Transcription Factor 1</i>)
AP1	Proteína activadora 1 (del inglés, <i>Activator Protein 1</i>)
BBB	Blood Brain Barrier (Barrera Hematoencefálica)
BHE	Barrera Hematoencefálica
BSA	Albúmina bovina (del inglés, <i>Albumin from Bovine Serum</i>)
CBP	Proteína de unión a CREB (del inglés, <i>CREB-binding protein</i>)
CCL22	Ligando quimioquina 22 (motivo C-C) (del inglés, <i>C-C motif chemokine 22</i>)
CCR4	Receptor 4 de quimioquinas con motivo C-C (del inglés, <i>C-C chemokine receptor 4</i>)
CD4	Cúmulo de diferenciación 4 (del inglés, <i>Cluster of Differentiation 4</i>)
CD8	Cúmulo de diferenciación 8 (del inglés, <i>Cluster of Differentiation 8</i>)
CD11b	Molécula del cúmulo de diferenciación 11b o Integrina alfa M (del inglés, <i>Cluster of Differentiation molecule 11b</i>)
CD14	Cúmulo de diferenciación 14 (del inglés, <i>Cluster of Differentiation 14</i>)
CD16	Cúmulo de diferenciación 16 o Receptor Fc de baja afinidad (del inglés, <i>Cluster of Differentiation 16</i>)
CD32	Cúmulo de diferenciación 32 (del inglés, <i>Cluster of Differentiation 32</i>)
CD45	Cúmulo de diferenciación 45 o Receptor tipo C de proteín tirosín fosfatasas (del inglés, <i>Cluster of Differentiation 45</i>)
CD86	Cúmulo de diferenciación 86 o B7-2 (del inglés, <i>Cluster of Differentiation 86</i>)
CD103	Cúmulo de diferenciación 103 o Integrina alfa E (del inglés, <i>Cluster of Differentiation 103</i>)
CD200R1	Receptor 1 del cúmulo de diferenciación 200 (del inglés, <i>Cluster of Differentiation 200 Receptor 1</i>)
CD206	Cúmulo de diferenciación 206 o Receptor de Manosas tipo 1 (del inglés, <i>Cluster of Differentiation 206</i>)

C/EBPβ	Proteína beta de unión al potenciador CCAAT (del inglés, <i>CCAAT/enhancer-binding protein beta</i>)
COX2	Ciclooxigenasa 2
CRE	Elemento de respuesta a AMPc (del inglés <i>cAMP Response Element</i>)
CREB	Proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc (del inglés, <i>cAMP response element-binding protein</i>)
CREM	Elemento modulador sensible a AMPc (del inglés, <i>cAMP Responsive Element Modulator</i>)
CTLA-4	Proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos o CD152 (del inglés, <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>)
DAB	Diaminobencidina
DMEM	Medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (del inglés, <i>Dulbecco's Modified Eagle's Media</i>)
DUSP1	Protein fosfatasa de especificidad dual (del inglés, <i>Dual Specificity Protein Phosphatase 1</i>)
EAE	Encefalomiелitis Autoinmune Experimental
eIF2α	Subunidad alfa del factor de iniciación eucariótico 2
EEM	Error Estándar de la Media
FACS	Separación celular activada por fluorescencia (del inglés, <i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>)
FBS	Suero Bovino Fetal (del inglés, <i>Fetal Bovine Serum</i>)
Fcγ	Fracción constante gamma
FDA	Administración de Drogas y Alimentos de EE.UU (del inglés, <i>U.S. Food and Drug Administration</i>)
Foxp3	del inglés, <i>Forkhead box P3</i>
GAPDH	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (del inglés, <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>)
GFAP	Proteína Fibrilar Ácida Glial (del inglés, <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>).
GPBAR1	Receptor de sales biliares unido a proteínas G 1 (del inglés, <i>G-protein coupled Bile Acid Receptor 1</i>)
HBSS	Solución salina tamponada de Hank (del inglés, <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>)
HRP	Peroxidasa de rábano (del inglés, <i>Horseradish peroxidase</i>)

HS	Suero de caballo (del inglés, <i>Horse Serum</i>)
Iba-1	Proteína adaptadora de unión a iones de calcio (del inglés, <i>Ionized calcium-binding adapter molecule 1</i>)
icv	Intracerebroventricular
IFNγ	Interferón gamma
IκB	Inhibidor de NF κ B (del inglés, <i>Inhibitor of kappa B</i>)
IL-1β	Interleuquina 1 β
IL-2	Interleuquina 2
IL-4	Interleuquina 4
IL-4Rα	Subunidad alfa del receptor de la Interleuquina-4
IL-6	Interleuquina 6
IL-10	Interleuquina 10
IL-12β	Subunidad β de la Interleuquina 12
IL-13	Interleuquina 13
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible (Inducible Nitric Oxyde Synthase)
ip	Intraperitoneal
IRAK-M	Quinasa M asociada al receptor de la IL-1 (del inglés, <i>Interleukin-1 receptor-associated kinase M</i>)
LPS	Lipopolisacárido
M1	Macrófagos/microglía de fenotipo proinflamatorio
M2	Macrófagos/microglía de fenotipo antiinflamatorio
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1 o CCL2 (del inglés, <i>Monocyte Chemotactic Protein 1</i>)
MHC II	Complejo principal de histocompatibilidad II (del inglés, <i>Major Histocompatibility Complex II</i>)
MIP-1α	Proteína inflamatoria de monocitos 1 α (del inglés, <i>Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha</i>)
NFκB	Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las células B activadas (del inglés, <i>Nuclear Factor Kappa-light-chain- enhancer of activated B-cells</i>)
NGS	Suero normal de cabra (del inglés, <i>Normal Goat Serum</i>)
NO	Óxido nítrico (del inglés, <i>Nitric Oxide</i>)

PB	Tampón fosfato (del inglés, <i>Phosphate Buffer</i>)
PBS	Tampón Salino Fosfato (del inglés, <i>Phosphate Saline Buffer</i>)
PD-L1	Ligando de muerte programada 1 o CD274 (del inglés, <i>Programmed death-ligand 1</i>)
PFA	Paraformaldehído
PKA	Proteín Quinasa A
PKR	Proteín Quinasa activada por ARN
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (del inglés, <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)
RANTES	Ligando de quimioquina 5 con motivos C-C o CCL-5 (del inglés, <i>Regulated on Activation, normal T cell Expressed and Secreted</i>)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species)
Rp-cAMPS	Rp-Adenosina 3',5'-monofosforotioato trietilamonio sal hidrato
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a retrotranscripción.
RPMI 1640	Medio de cultivo del Instituto Roswell Park Memorial 1640 (del inglés, <i>Roswell Park Memorial Insitute 1640 Medium</i>)
RPS29	Proteína ribosomal S29 (del inglés, <i>40S Ribosomal Protein S29</i>)
SDS	Dodecil Sulfato Sódico
siARN	Ácido Ribonucleico pequeño de interferencia (del inglés, <i>small interfering RNA</i>)
SN	Sistema Nervioso
SNC	Sistema Nervioso Central
Sphk1	Esfingosina quinasa 1 (del inglés, <i>Sphingosine kinase 1</i>)
TBS	Tampón tris salino (del inglés, <i>Tris-buffered saline</i>)
TGFβ	Factor de crecimiento transformador beta (del inglés, <i>Transforming Growth Factor Beta</i>)
TGR5	Receptor Takeda acoplado a proteínas G (del inglés, <i>Takeda G protein-coupled receptor 5</i>)
Th1	Linfocitos T ayudantes 1 (del inglés, <i>Type 1 helper T cell</i>)
Th2	Linfocitos T ayudantes 2 (del inglés, <i>Type 2 helper T cell</i>)
TLCA	Taurolitocolato sódico
TLR	Receptor de tipo Toll (del inglés, <i>Toll-like receptor</i>)

TNFα	Factor de necrosis tumoral α (del inglés, <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>)
Treg	Linfocitos T reguladores
TUDCA	Ácido Tauroursodeoxicólico
UDCA	Ácido Ursodeoxicólico
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular 1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1)
Ym1	Chitinasa 3



INTRODUCCIÓN

1. El proceso inflamatorio en el Sistema Nervioso

En el sistema nervioso central (SNC), la barrera hematoencefálica (BHE) limita y controla selectivamente el acceso de sustancias y células desde la sangre al parénquima nervioso, favoreciendo la homeostasis del sistema. Las células gliales, y en especial la microglía (macrófagos residentes del SNC), vigilan constantemente el SNC y responden ante cualquier variación en el medio (Aloisi 2001, Nimmerjahn y cols. 2005). Cualquier alteración de la homeostasis del SNC (infección, traumatismos, mal plegamiento de proteínas, enfermedad degenerativa o isquemia, entre otros) modifica la morfología y el estado de activación de las células gliales, desencadenando una respuesta inflamatoria y el consiguiente estrés oxidativo y liberación de moléculas proinflamatorias, produciendo un proceso de neuroinflamación aguda a corto plazo, que está regulado por la respuesta inmune innata de las células residentes.

La neuroinflamación crónica implica una activación a largo plazo de la microglía y la consiguiente liberación de mediadores inflamatorios, perpetuadores de la inflamación por estrés oxidativo y liberación de especies reactivas; por esto es potencialmente dañina y puede derivar en daños celulares (neuronales o gliales; Figura 1). Las citoquinas liberadas aumentan la permeabilidad de la BHE, aumentando la expresión de proteínas en el endotelio vascular (como VCAM-1) que favorecen la extravasación de los leucocitos sanguíneos al parénquima nervioso. Estas células exógenas al SNC colaboran, junto con las células residentes, en la liberación de mediadores proinflamatorios y el aumento de especies reactivas. Este proceso puede, o resolver el proceso inflamatorio, o aumentar su neurotoxicidad, desencadenando una retroalimentación positiva entre la muerte neuronal y la inflamación aguda, haciendo que se extienda en el tiempo y cronifique (Block y cols. 2007).

El fallo en la resolución de la inflamación cobra especial relevancia en el caso de las enfermedades neurodegenerativas (como la esclerosis múltiple, la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica, tauopatías y la degeneración macular asociada a la edad), ya que vienen acompañadas de una excesiva activación microglial y neuroinflamación crónica (Frank-Cannon y cols. 2009). Además, la inflamación es un elemento clave en la fisiopatología del dolor crónico, la lesión medular, y enfermedades neuropsiquiátricas como ansiedad/depresión y esquizofrenia (Skaper y cols. 2014).

Por esto, el control y la correcta resolución del proceso neuroinflamatorio son dianas terapéuticas muy interesantes para el tratamiento de múltiples patologías del sistema nervioso.

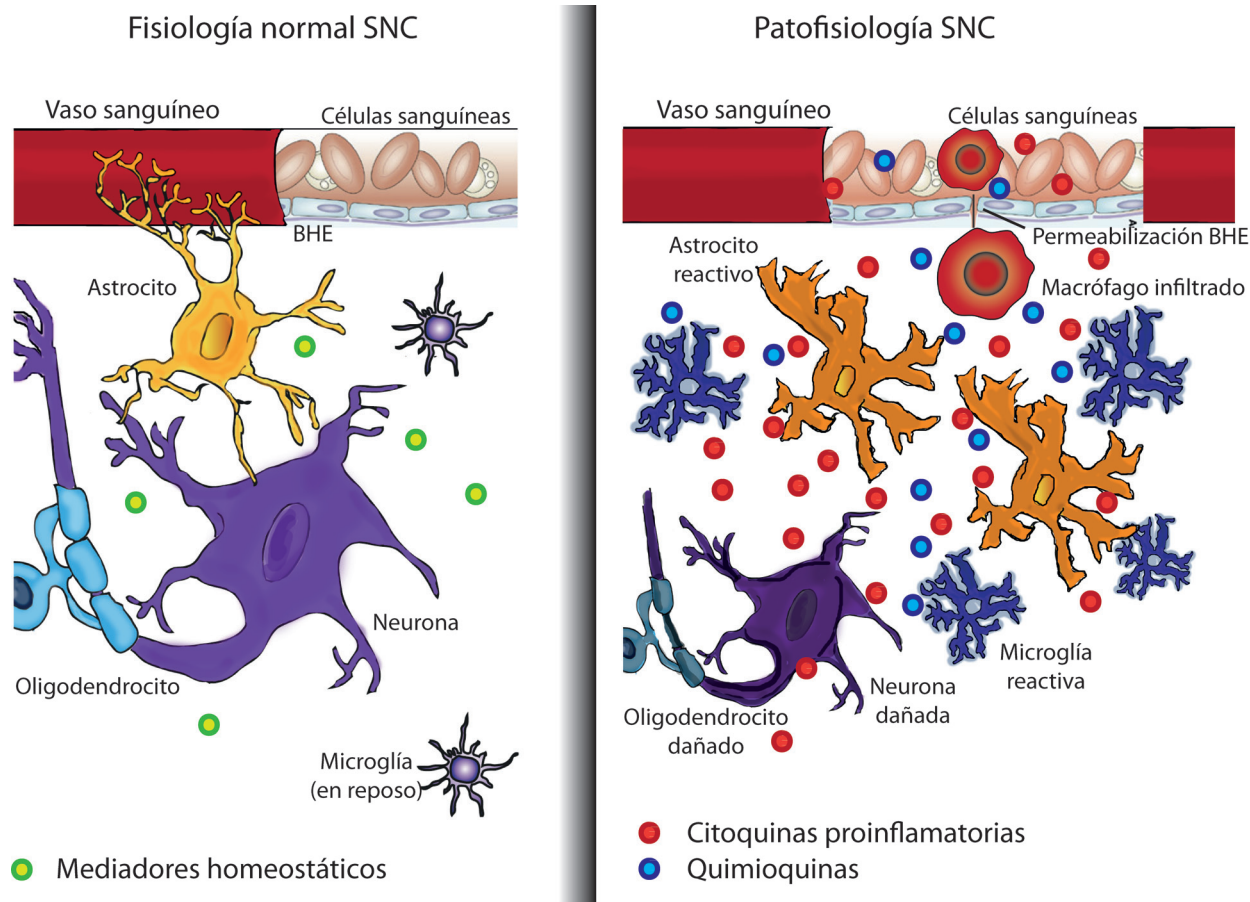


Figura 1. Esquema explicativo del proceso inflamatorio en el SNC. En condiciones fisiológicas normales, las células del SNC interactúan entre sí tanto por contacto directo como por secreción de moléculas que facilitan un correcto funcionamiento y homeostasis del sistema. En condiciones patológicas, por el contrario, las células gliales se tornan reactivas y liberan mediadores proinflamatorios o incluso neurotóxicos, que pueden causar daños neuronales y tisulares, exacerbando la patología.

2. Modelo de neuroinflamación por inyección intracerebroventricular de LPS

La neuroinflamación es, por tanto, el resultado de diferentes agresiones al sistema nervioso que convergen en un resultado común: la producción local de mediadores inflamatorios como citoquinas proinflamatorias, quimioquinas que favorecen la entrada de leucocitos al SNC y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, entre otros.

Entre la gran variedad de moléculas que pueden desencadenar el proceso inflamatorio se encuentra un componente de la pared celular de bacterias gram negativas, el lipopolisacárido (LPS). Este, estimula el receptor TLR4 en la microglía e induce la secreción de especies reactivas de oxígeno y citoquinas proinflamatorias

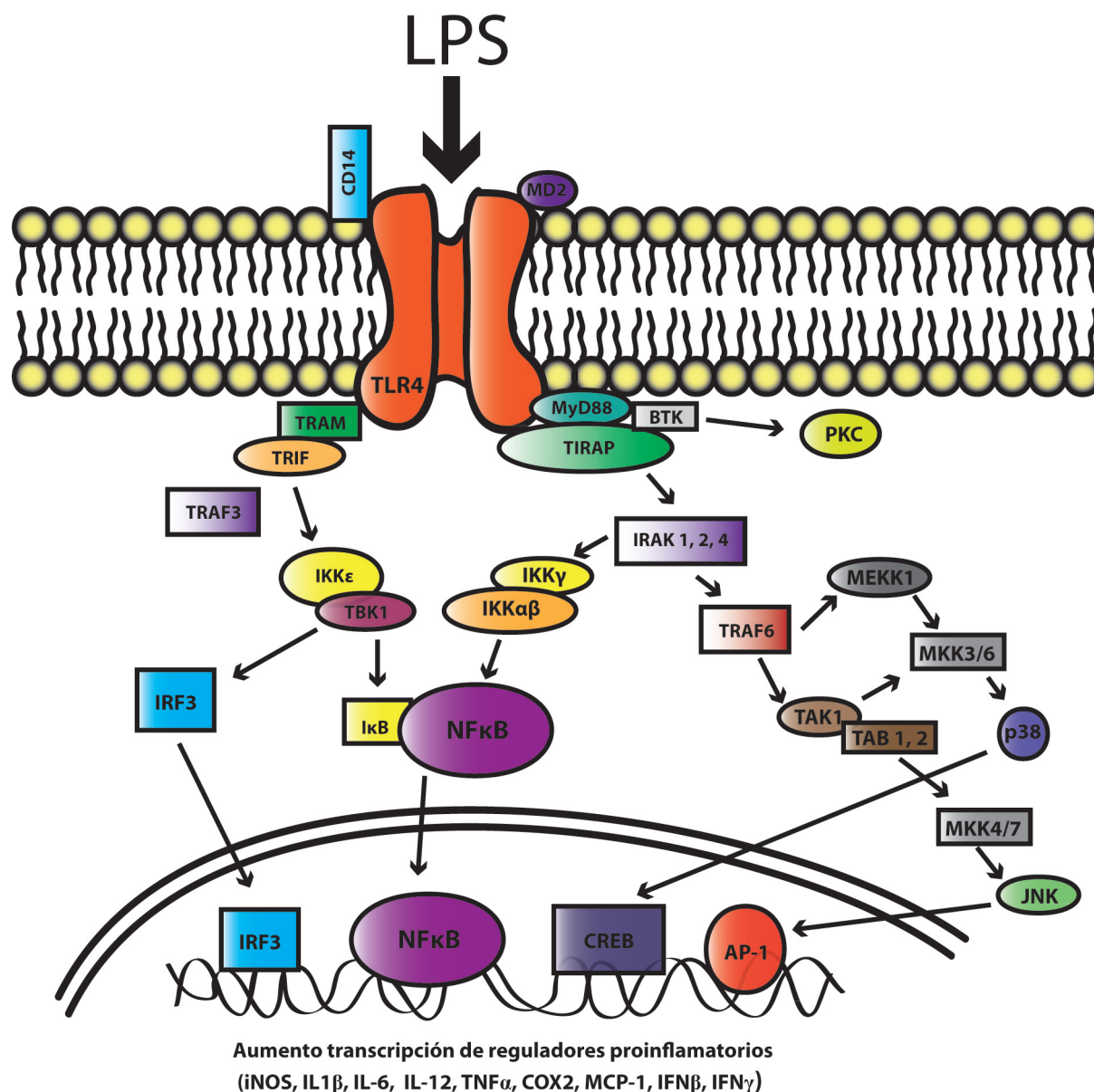


Figura 2. Cascada proinflamatoria inducida por LPS. La unión del LPS al receptor TLR4 desencadena una serie de cascadas intracelulares que finalmente producen la translocación de factores de transcripción desde el citoplasma al núcleo (como NF κ B, IRF3, CREB o AP-1) y un aumento de la transcripción de proteínas reguladoras de la inflamación, tanto de genes proinflamatorios entre los que se encuentran la iNOS, IL-1 β , IL-12, IFN γ , TNF α , COX2, MCP-1, como de genes antiinflamatorios como el IFN β .

que pueden llevar a la degeneración neuronal progresiva (Lehnardt y cols. 2002, Lehnardt y cols. 2003). Las neuronas no expresan este receptor, por lo que el LPS no es neurotóxico *per se*, sino que su efecto en la muerte neuronal es debido a la activación microglial. La expresión de TLR4 aumenta durante el envejecimiento fisiológico y tras el daño cerebral (Letiembre y cols. 2007, Walter y cols. 2007) y contribuye a la patogénesis del SNC tanto tras una lesión de la médula espinal como tras procesos de isquemia cerebral (Tanga y cols. 2005, Hua y cols. 2007).

El LPS es un potente activador del factor de transcripción NFκB. Este factor es clave en la regulación de la inflamación, y se activa por una gran variedad de señales. Una vez activado, NFκB desencadena una rápida respuesta a estímulos celulares nocivos, induciendo la expresión de proteínas de una gran importancia inmunológica, implicadas en la supervivencia celular, la inflamación y la respuesta al estrés (Ziegler-Heitbrock y cols. 1994, Sheikh y Huang 2003, Hayden y Ghosh 2008). Asimismo, ha sido descrita una fuerte activación de NFκB en la microglía en diversos modelos animales de enfermedades neurodegenerativas (Bonetti y cols. 1999, Mattson y Camandola 2001).

NFκB se expresa constitutivamente en el citoplasma celular, donde se encuentra en un estado basal inactivo, debido en parte a la unión de las proteínas inhibitorias IκB a la secuencia de localización nuclear del NFκB. Es necesaria la fosforilación de IκB y también la del propio NFκB por la IκB-quinasa (IKKs) para que IκB se disocie del NFκB y este último pueda translocarse al núcleo, donde se une a elementos génicos específicos e induce los cambios transcripcionales pertinentes (Jacobs and Harrison 1998).

La unión del LPS a su receptor TLR4 en sus células diana (Figura 2), desencadena una serie de cascadas de activación, que implican la translocación de NFκB al núcleo, y llevan a la producción de reguladores inflamatorios como la iNOS, IL-1β, IL-6, IL-12, TNFα, COX2, MCP-1, IFNβ o IFNγ entre otros. La liberación de estas moléculas desencadena la activación de microglía y astrocitos.

3. Moléculas moduladoras del ambiente proinflamatorio

En el metabolismo celular existen moléculas, consideradas a continuación, que regulan el ambiente proinflamatorio intracelular favoreciendo el retorno a una situación de homeostasis celular basal.

3.1- El AMPc

El AMPc es un segundo mensajero celular implicado en la transducción de señales intracelulares, tras la estimulación de receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas del tipo Gs, y que activa las quinasas PKA. La subunidad alfa de la proteína Gs activa el enzima adenilato ciclasa, que sintetiza AMPc a partir de ATP. En un contexto proinflamatorio, el AMPc favorece la flexibilidad metabólica y permite la supervivencia neuronal. Además, contrarresta los efectos negativos de la mielina en la regeneración axonal de neuronas dañadas y estimula el crecimiento neurítico en líneas celulares y en neuronas *in vivo* (Gunning y cols. 1981, Neumann y cols. 2002, Bhatt y cols. 2004, Hannila y Filbin 2008).

El aumento local de los niveles de AMPc induce la activación de la quinasa PKA, que a su vez fosforila y activa varios factores de transcripción. Entre ellos, está el factor de transcripción CREB. Esta proteína regula diferentes respuestas celulares, entre las que se encuentran la proliferación, supervivencia y diferenciación celular. CREB se activa por factores de crecimiento o estímulos proinflamatorios y media la transcripción de genes con el elemento de respuesta a AMPc (CRE), como los de la IL-2, IL-6, IL-10, factores de inhibición de migración de monocitos y TNF α .

Generalmente, el AMPc promueve respuestas inmunes antiinflamatorias, inhibiendo la actividad de NF κ B, y aumentando la inducción de la IL-10 y la generación de linfocitos Treg. Sin embargo, la activación de la quinasa PKA y de CREB son necesarias también para la completa activación de la ruta proinflamatoria (Wen y cols. 2010).

3.2- La familia de la citoquina TGF β

Se han descrito, también, señales constitutivas que, liberadas por la propia célula, la mantienen en un estado basal inactivo. La desaparición del medio de señales como el factor de crecimiento transformador beta (TGF β), los glucocorticoides o la IL-10, puede desencadenar la activación de las células gliales (Lindholm y cols. 1992, van Rossum y Hanisch 2004).

La familia del TGF β está involucrada en la regulación del desarrollo, la inhibición de la proliferación celular, la supervivencia neuronal, la diferenciación de linfocitos T, la migración celular y la inhibición de la activación de monocitos. Asimismo, TGF β contrarresta los efectos de las citoquinas proinflamatorias (Kriegelstein y cols. 1995, Horbelt y cols. 2012). Las señales de TGF β se transducen mediante la

heterooligomerización de sus receptores de TGF β tipo 1 y tipo 2 (TGFBR1 y TGFBR2). Tras la unión del TGF β al receptor tipo 2, que es una serin/treonin quinasa activa constitutivamente, el receptor tipo 1 es reclutado al complejo y fosforilado. Esta fosforilación permite propagar la señal del TGF β a las proteínas Smad2 y Smad3, que son fosforiladas directamente tras la interacción con el TGFBR1 y forman un complejo que se transloca al núcleo e interacciona con otros factores de transcripción que regulan la transcripción génica (Wrana y cols. 1994, Nakao y cols. 1997, Derynck y Zhang 2003).

En el sistema nervioso de mamíferos existen tres isoformas descritas de TGF β , cada una con una función diferente (Leask y Abraham 2004). El TGF β_1 es la isoforma que se induce tras una agresión al sistema nervioso, favorece la proliferación, la angiogénesis y está implicada en la regulación de la respuesta inmune (Buckwalter y Wyss-Coray 2004, Bierie y Moses 2006). El isotipo TGF β_2 es un inhibidor de la proliferación de los linfocitos T tras su activación por antígenos, y está implicado en la respuesta profibrótica, regulando la proliferación y apoptosis de las células circundantes (Constam y cols. 1992, Balzar y cols. 2005). El tercer isotipo, TGF β_3 , es una molécula determinante para el desarrollo, induciendo la proliferación celular y angiogénesis. Además promueve la respuesta de linfocitos reguladores (Treg) e inhibe la respuesta Th1 (Bottner y cols. 2000, Shah y Qiao 2008).

Aunque clásicamente se ha considerado el TGF β_1 como el isotipo producido por las células de microglía, el TGF β_2 por los astrocitos, y el TGF β_3 por células gliales y neuronas, recientemente se ha demostrado que esta clasificación no está tan clara, pues la microglía puede producir TGF β_2 (Polazzi y cols. 2009) y los astrocitos producen TGF β_1 (Diniz y cols. 2014).

4. Importancia de las células gliales en el proceso neuroinflamatorio

La cronificación de la neuroinflamación es un proceso fundamental implicado en la progresión de múltiples enfermedades neurodegenerativas. En el sistema nervioso, las respuestas inflamatorias se llevan a cabo por un sistema inmune multi-componente que incluye la microglía y las células inmunes circulantes que se infiltran en el parénquima, como monocitos y linfocitos T. Además, hay células no inmunes del SNC, como los astrocitos y las neuronas, que pueden contribuir a la modulación de la respuesta inmune.

En respuesta a una agresión externa, las células gliales (astrocitos y microglía) se transforman en glía reactiva caracterizada por sufrir cambios morfológicos y

aumentar la secreción de mediadores inflamatorios, como citoquinas, radicales libres, así como neurotrofinas, factores de crecimiento y proteínas de la matriz extracelular, que pueden favorecer la supervivencia o inducir la muerte de las neuronas cercanas, de las propias células gliales y de otros tipos celulares (John y cols. 2005, Gonzalez y cols. 2014).

4.1- Microglía

Las células microgliales tienen una función muy relevante en el SNC, porque son los monocitos residentes del cerebro y su única célula inmune residente, y constituyen aproximadamente el 12% del total de células cerebrales (Ransohoff y Perry 2009).

A pesar de que Nissl las describiera por primera vez en 1899 como unas células gliales alargadas y reactivas (Nissl 1899), fue Pío del Río-Hortega quien las caracterizó y describió sus fenotipos morfológicos, dándoles su nombre y diferenciándolas del resto de células gliales (Del Río-Hortega P 1927, Del Río-Hortega 1932). El origen ontológico de estas células ha sido muy controvertido desde que fueron descubiertas, pero recientemente, gracias al uso de cepas de ratones modificados genéticamente, se ha establecido que provienen de células eritromieloides c-kit⁺ precursoras del saco vitelino, que aparecen en el parénquima nervioso en el día embrionario 8 (Ginhoux y cols. 2010, Kierdorf y cols. 2013). A pesar de su origen mesenquimal, se especializan como una población residente, que se perpetúa a sí misma y no se recambia por infiltración de células periféricas (Ajami y cols. 2007, Ginhoux y cols. 2013, Biber y cols. 2014).

En su estado “en reposo”, la microglía tiene una morfología característicamente ramificada, aunque nunca se encuentran en un estado completamente quiescente, ya que tiene procesos de alta motilidad con los que examina continuamente el parénquima que las rodea. Las células microgliales son las primeras que responden a una infección o un daño tisular, iniciando la respuesta inflamatoria. Pueden comunicarse selectivamente con el resto de células gliales, neuronas o células del sistema inmune mediante la activación de diferentes rutas de señalización intracelular y la liberación de mediadores específicos. El TGF β es uno de los factores que parecen mantener a la microglía en un estado de reposo, porque está presente en altas concentraciones en el SNC en condiciones no patológicas y parece tener efectos antiinflamatorios en estas células (Kim y cols. 2004, Le y cols. 2004, Hinkerohe y cols. 2005, Boche y cols. 2006, Qian y cols. 2008). Recientemente, la expresión de la proteína TGF β_1 y su receptor (TGFBR1) han sido propuestos como marcadores específicos de microglía (Butovsky y cols. 2014).

Las células de microglía son el primer tipo celular que detecta y responde a una situación patológica. Ante cualquier alteración potencialmente nociva sufren una activación compleja en varias fases hasta un estado “activado”, caracterizado por una elevada capacidad migratoria al foco de inflamación y alta capacidad proliferativa y fagocítica (Kettenmann y cols. 2011). Dependiendo del contexto de la lesión, la microglía puede generar tanto situaciones de daño tisular como protectoras y regenerativas (David y Kroner 2011). Esto es así porque si la respuesta neuroinflamatoria inicial no es capaz de restaurar la homeostasis, la neuroinflamación crónica puede producir daños en oligodendrocitos y neuronas, desencadenando los déficits funcionales característicos de las patologías del SNC (Popovich y cols. 2002, Hausmann 2003). La microglía regula la respuesta inflamatoria crónica liberando una gran cantidad de mediadores, entre los que se encuentran citoquinas pro y antiinflamatorias y quimioquinas que incrementan la permeabilidad de la BHE, que inducen la activación y reclutamiento de monocitos, linfocitos y neutrófilos de la sangre al foco de inflamación del tejido nervioso (Aloisi y cols. 2001, Lucas y cols. 2006).

Históricamente, la activación de la microglía se ha clasificado en dos tipos: clásica o alternativa. La activación clásica, que se produce tras la estimulación de receptores TLR (entre otros) por sus ligandos, IFN γ o por citoquinas liberadas por los linfocitos Th1, desencadena la liberación de citoquinas proinflamatorias como el TNF α , IL-6, IL-1 β , IFN γ , MCP-1 y de otros mediadores proinflamatorios, como el óxido nítrico (Mosser 2003, Saijo y Glass 2011, Boche y cols. 2013), que favorecen la activación de las células gliales circundantes. Esta activación genera un fenotipo microglial proinflamatorio (M1) caracterizado por la expresión incrementada de moléculas que permiten la presentación de antígenos (MHCII, CD86, receptores Fc γ), la liberación de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-12) y la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, como la iNOS (Skeen y cols. 1996, MacMicking y cols. 1997, Taylor y cols. 2005). Una vez que el daño ha sido eliminado, la microglía regula su propia polarización de una manera autocrina y paracrina para volver a un estado de reposo (Perry y Teeling 2013).

Tabla 1. Marcadores de los fenotipos de macrófagos y microglía. Recopilación de los marcadores descritos característicos del fenotipo proinflamatorio (M1) o antiinflamatorio (M2) descritos en la bibliografía, su función general y su función en SNC. Fuentes: (Stein y cols. 1992, Bagasra y cols. 1995, Skeen y cols. 1996, MacMicking y cols. 1997, Munder y cols. 1999, Mantovani y cols. 2004, Taylor y cols. 2005, van't Veer y cols. 2007, Bouhrel y cols. 2008, Martinez y cols. 2008, Anders y Ryu 2011, Manrique y cols. 2011, Zhao y cols. 2014, Gensel y Zhang 2015).

Activación	M2 (A. Alternativa)			
Subtipo	M1	M2a	M2b	M2c
Estímulo	LPS TNF α Citoquinas producidas por LTh1 IFN γ GM-CSF	IL-4 IL-13 Agonistas de PPAR γ	LPS y Agonistas de TLR Complejos inmunes (Agonistas de la fracción Fc) Agonistas de IL-1R	IL-10 TGF β Glucocorticoides
Marcadores comunes	CD14 ↑Receptores Fc γ (CD16, CD32) CD86 ↑ROS IFN IL-1 β IL-6 ↓IL-10 ↑IL-12 IL-23 iNOS MARCO MCP-1 MHCII ↑TLR TNF α	Arginasa 1 ↓ROS CD200R1 Fizz-1 IGF-1 IL1RN Lectinas MHCII P2Y12 P2Y13 Rec. Manosas Rec. Scavenger Socs3 TREM2 Ym1 Arginasa 1 CD14 CD163 HMOX-1 IL-4R IL-10R ↓ MHCII	↑ IL-10 ↓ IL-12	PD-L1
			CD64 CD86 CD200R1 IGF-1 IL-6 IRAK-M MCP-1 ↑MHCII TNF α VEGF	P2Y14 Rec. Manosas Rec. Scavenger SLAM Sphk1 TGF β THBS1
Factores de señalización	NF κ β , STAT1, IRF5, AP-1	STAT6, KFL2, IRF4, PPARs	NF κ β , PI3K/Akt	STAT3
Función	Proinflamatoria. Catalizar la inflamación. Eliminación de debris celular, de células apoptóticas y de agentes patógenos.	Reparación de lesión. Profibrótica. Antiinflamatoria. Neuroprotección. Fagocitosis y eliminación de células apoptóticas. Proliferación y migración celular. Síntesis de factores de crecimiento. Activación de linfocitos Th2.	Immunorregulación. Activación de linfocitos Treg e inhibición de LTh1 Maduración celular. Homeostasis tisular. Angiogénesis. Síntesis de matriz extracelular.	Activación de linfocitos Treg e inhibición de LTh1. Resolución de la inflamación. Reparación tisular. Síntesis y remodelación de matriz extracelular. Síntesis de factores de crecimiento. Aumento proliferación NSC.
Efectos en SNC	Cronificación de la neuroinflamación.	Remielinización, regeneración axonal y reducción de muerte.	Regeneración axonal.	Desactivación/Reparación de lesión.

La activación alternativa induce la secreción de citoquinas y la expresión de receptores más relacionados con la inhibición de la inflamación, la recuperación de la homeostasis y la regeneración (Varin and Gordon 2009). Se describió como alternativa porque se producía *in vitro* tras tratar los macrófagos murinos con IL-4 (Stein y cols. 1992), aunque se ha visto que también es iniciada por citoquinas producidas por los linfocitos Th2 (como IL-4 e IL-13) además de por IL-10 y TGF β (Zhou y cols. 2012).

En los últimos años la activación alternativa se ha clasificado en tres subtipos, porque en función del estímulo que induzca el fenotipo antiinflamatorio, la secreción de citoquinas y la función de la microglía varían.

El estado de activación alternativa original, al que me referiré como M2a, presenta un incremento en la expresión del receptor de manosas (CD206) y las proteínas Arg1, Ym1 y FIZZ1 entre otras (ver Tabla 1). Esta microglía se caracteriza por la expresión del enzima Arg1 y el incremento en la producción y liberación de poliaminas con propiedades antiinflamatorias y neuroprotectoras. La microglía M2 es antiinflamatoria porque la activación de la enzima Arg1 compite por el aminoácido arginina con la iNOS (marcador de microglía M1), que es el sustrato común de ambos, el factor de transcripción NF κ B está inhibido y exhibe una elevada capacidad fagocítica (Bansal y Ochoa 2003, Taylor y cols. 2005, Kigerl y cols. 2009, Gadani y cols. 2012, Sica y Mantovani 2012).

Un segundo tipo de activación alternativa son las células M2b, que aparecen tras la exposición a complejos inmunes o la estimulación de receptores TLR (Mantovani y cols. 2004, Edwards y cols. 2006). Curiosamente estas células se parecen bastante a las M1, ya que requieren una activación previa y no tienen los marcadores M2 típicos. Sin embargo, el patrón de expresión de citoquinas es característicamente M2 (elevada IL-10 y baja IL-12; Mosser y Edwards 2008) y además presentan una mayor expresión de MHCII y CD86, lo que sugiere que mantienen la capacidad de estimular linfocitos T (Edwards y cols. 2006).

Por último, han sido caracterizadas las células con fenotipo M2c. Se generan tras la exposición a IL-10, TGF β o glucocorticoides, y aunque inicialmente fueron descritas como células inactivas, ahora sabemos que están implicadas en la remodelación de tejidos y en la deposición de matriz extracelular tras la reducción de la inflamación (Mantovani y cols. 2004, Martinez y cols. 2008).

Como se ha mencionado anteriormente, el TGF β , además de inducir este subfenotipo, también es capaz de inhibir la microglía proinflamatoria por sí mismo (Qian y cols. 2008). Es más, estudios recientes muestran que el isotipo TGF β_1 incrementa la activación alternativa de la microglía inducida por IL-4, aumentando la expresión de Arg1, Ym1 y del IL4R α . A su vez, la IL-4 aumenta la secreción del isotipo TGF β_2 por la microglía, lo que genera una retroalimentación positiva de la respuesta antiinflamatoria (Zhou y cols. 2012).

4.2- Astrocitos

Los astrocitos son células gliales especializadas muy numerosas en el SNC, cinco veces más abundantes que las neuronas, y están conectados física y funcionalmente entre sí. Realizan funciones básicas para el buen funcionamiento del sistema nervioso, como el mantenimiento del pH y del equilibrio iónico extracelular, o la regulación de la entrada de nutrientes y la salida de productos de deshecho a través de la BHE. En cuanto a la interacción con el resto de células, sus funciones principales son actuar como soporte estructural, trófico y funcional de las neuronas y células gliales, la liberación de gliotransmisores para modular la actividad sináptica, aunque también participan en la formación y remodelado de las sinapsis. Los astrocitos tienen también la capacidad de reaccionar, activarse y responder a situaciones de inflamación y de respuesta inmune, como un mecanismo de defensa para proteger al SNC (Markiewicz y Lukomska 2006, Farina y cols. 2007, Perea y cols. 2009, Sofroniew y Vinters 2010). La activación de los astrocitos es generalmente posterior a la de la microglía. Recibe el nombre de astrogliosis y, como en el caso de la microglía, no se trata de un fenómeno de todo o nada, sino que es un proceso continuo de cambios que ocurren de manera dependiente del contexto y está finamente regulado por señales concretas. Estos cambios varían desde alteraciones reversibles en la expresión génica y la hipertrofia celular con preservación de los dominios celulares y la estructura del tejido, a la formación de cicatrices gliales de larga duración con reorganización de la estructura tisular (Sofroniew y Vinters 2010).

Los astrocitos son unos reguladores importantes de la neuroinflamación, ya que, cuando se transforman en astrocitos reactivos en respuesta a estímulos proinflamatorios (como IL-1 β , IFN γ o TNF α), liberan una gran cantidad de citoquinas y quimioquinas pro o antiinflamatorias, que derivan en efectos potencialmente neurotóxicos o neuroprotectores (John y cols. 2003).

5. Células del sistema inmune

Las células circulantes del sistema inmune y las residentes del SNC son capaces de interactuar entre sí, mediante la liberación de mediadores inflamatorios, así como por contacto directo. La activación de células gliales conlleva el reclutamiento y activación de células inmunes circulantes mediante la liberación de quimioquinas y citoquinas. Esta activación favorece la sobreexpresión de moléculas de adhesión endoteliales, que permiten la extravasación de linfocitos, monocitos, neutrófilos y granulocitos de la sangre sin alterar la integridad física de la BHE (Hickey y cols. 1991, Tran y cols. 2000, Engelhardt y Ransohoff 2005).

La infiltración de monocitos sanguíneos y linfocitos al parénquima cerebral es un suceso muy frecuente en diferentes patologías que cursan con neuroinflamación, como son la isquemia, la lesión mecánica, la esclerosis múltiple, las enfermedades de Alzheimer o Parkinson, entre otras (Traugott y Lebon 1988, Date y cols. 1991, Kigerl y cols. 2009, Benakis y cols. 2014, Lathe y cols. 2014).

En respuesta al contacto directo o a la liberación de mediadores por las diferentes poblaciones de linfocitos, los macrófagos y la microglía pueden diferenciarse a distintos fenotipos que, a su vez, regulan las poblaciones de linfocitos. Los linfocitos Th1 producen IFN γ , que polariza los macrófagos hacia un fenotipo M1 (Nathan y cols. 1983). Estos, por su parte, segregan IL-12, que mantiene activada esta población de linfocitos, favoreciendo la capacidad de presentación antigénica y la muerte de patógenos intracelulares (Figura 3, adaptada de Biswas y Mantovani 2010). Por su parte, los linfocitos Th2 segregan las citoquinas IL-4, IL-13 e IL-33 que favorecen la diferenciación hacia macrófagos M2a. Estos segregan diversas quimioquinas que promueven la respuesta Th2, favoreciendo la remodelación tisular entre otros procesos. Por último, existe una retroalimentación positiva entre los macrófagos M2b y M2c y los linfocitos Treg, mediada principalmente por la secreción de IL-10 por parte de ambos tipos celulares. Además, estos macrófagos tipo M2b y M2c inhiben la respuesta Th1.

Los linfocitos T reguladores tienen una función inmunosupresora, con una activación específica de antígeno, lo que limita la actividad de las células autorreactivas

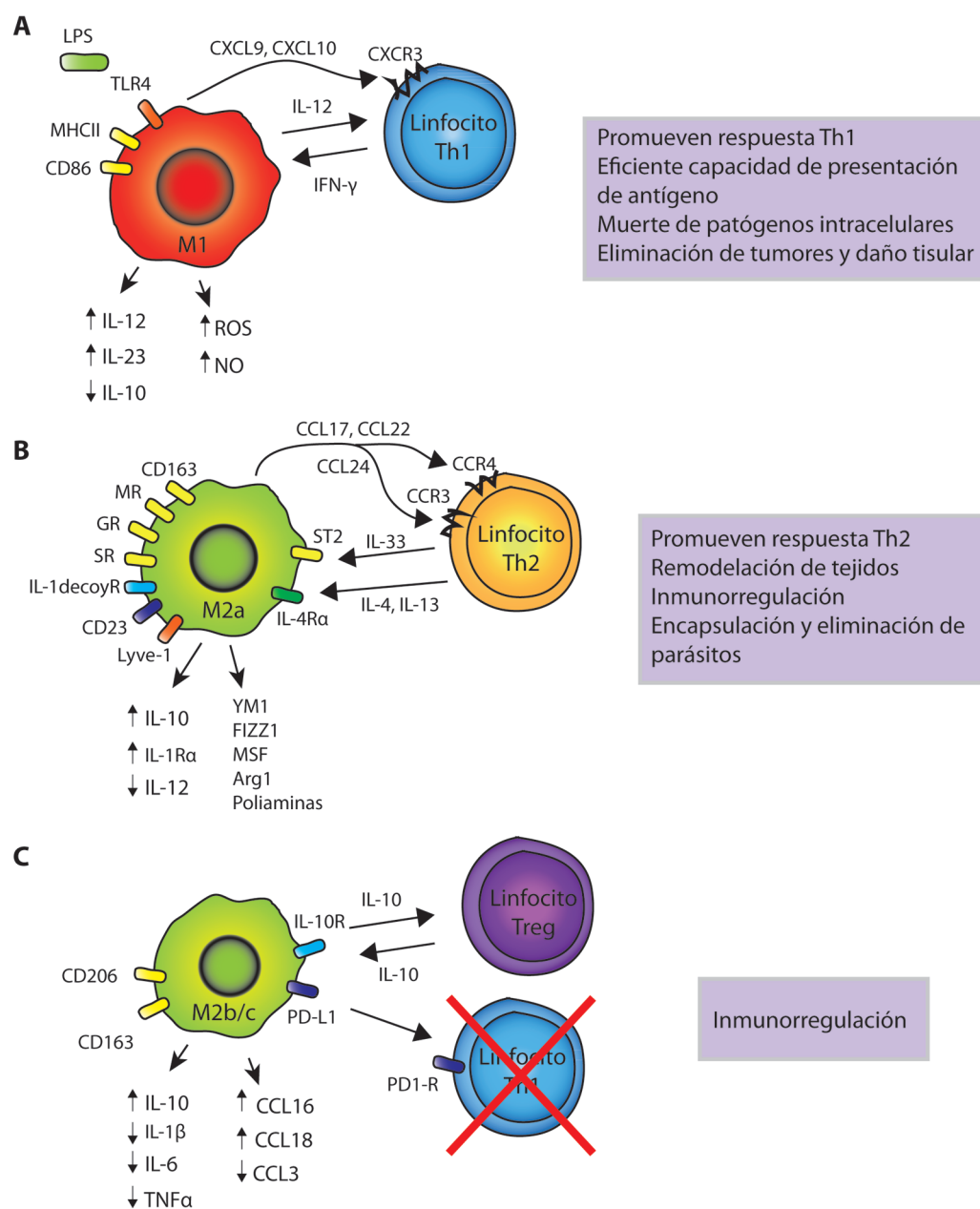


Figura 3. Interacciones entre linfocitos y macrófagos-microglía. Los linfocitos y los macrófagos-microglía se comunican entre sí tanto por contacto directo como por la secreción de mediadores inflamatorios. A) Los linfocitos Th1 favorecen la inducción del fenotipo M1 en macrófagos-microglía mediante la liberación de IFN γ al medio. Los macrófagos M1, a su vez, promueven la respuesta Th1 mediante la secreción de citoquinas y quimioquinas. B) Los linfocitos Th2 favorecen la inducción del fenotipo M2a gracias a la liberación de IL-4, IL-13 e IL-33. Los macrófagos-microglía con fenotipo M2a, a su vez, favorecen la respuesta Th2 gracias a la liberación de una variedad de quimioquinas al medio. C) Los linfocitos Treg secretan una gran cantidad de IL-10, que lleva a los macrófagos-microglía a diferenciarse al fenotipo antiinflamatorio M2b o M2c. Esto produce una retroalimentación positiva de la producción de IL-10 por ambos tipos celulares, favoreciendo la población de linfocitos Treg y además inhibiendo la respuesta proinflamatoria de los linfocitos Th1 mediante la interacción de PD-L1 y su receptor. Adaptado de Biswas y cols. 2010.

que no se han eliminado en el proceso de tolerancia central (Gavin y Rudensky 2003, Cobbold y cols. 2006). Una vez activados, la capacidad supresora de los linfocitos reguladores pierde su especificidad antigénica y son capaces de restringir la proliferación y liberación de citoquinas de una gran variedad de células inmunes (CD4, CD8, NK, NKT, monocitos, monocitos y células dendríticas; Thornton y Shevach 1998, Lowther y Hafler 2012). La principal molécula antiinflamatoria mediante la cual realizan su acción supresora es el TGF β , tanto secretado como presentado en la superficie celular (Vignali y cols. 2008). El TGF β , además de inhibir la diferenciación de linfocitos T naïve, induce la expresión del factor de transcripción Foxp3 por los linfocitos T. En ausencia de otros estímulos inflamatorios, este factor induce la desmetilación parcial de su propio locus, permitiendo a CREB estabilizar su expresión, promoviendo y manteniendo el fenotipo Treg (Curotto de Lafaille y Lafaille 2009). Foxp3 es un factor de transcripción que regula la expresión de un conjunto de genes entre los que se encuentran el CTLA-4 y el TGF β , que confieren características supresoras a los linfocitos CD4⁺ (Walsh y Kipnis 2011). La expresión de Foxp3 es suficiente para que los linfocitos CD4⁺ adquieran un fenotipo supresor en ratones, y determina la función de los linfocitos Treg (Fontenot y cols. 2003, Sakaguchi y cols. 2010).

Las interacciones entre las células del SNC y los linfocitos Treg han sido estudiadas minuciosamente. La microglía, mediante la producción de la quimioquina CCL22, que interacciona con el CCR4 de la superficie de los linfocitos, puede atraer a los linfocitos Treg al SNC (Kipnis y cols. 2004). La producción de IL-10 por las células del SNC es capaz de mantener la expresión de Foxp3 en los linfocitos (Murai y cols. 2009). Asimismo, el contacto directo de las neuronas y los astrocitos con células autoinmunes puede transformarlas en Tregs, suprimiendo la proliferación de linfocitos T autorreactivos en modelos de EAE (Trajkovic y cols. 2004, Liu y cols. 2006).

6. Estrategias de control de la neuroinflamación: las sales biliares

Las sales biliares son compuestos sintetizados en el hígado, que forman parte de la secreción biliar liberada durante la digestión. Son sintetizadas a partir de colesterol y pueden estar conjugadas con glicina o taurina. Algunas sales biliares, como el tauroursodeoxicolato sódico (TUDCA) y el ursodeoxicolato sódico (UDCA), inhiben la muerte neuronal tanto en cultivos de neuronas como en modelos animales de isquemia/reoxigenación, reduciendo significativamente el área de lesión (Keene y cols. 2002, Rodrigues y cols. 2002, Rodrigues y cols. 2003). Estas sales tienen también

un efecto antiinflamatorio sobre la línea celular de microglía BV-2, porque reduce la producción de nitritos tras el tratamiento con el péptido β -amiloide (Joo y cols. 2004).

Las sales biliares son una herramienta terapéutica muy interesante porque, además de ser compuestos que sintetiza nuestro cuerpo de manera natural, pueden ser administrados por vía oral, intravenosa o intraperitoneal, y atraviesan sin problemas la BHE (Rodrigues CM y cols. 2002). Tanto el uso del UDCA como el de su conjugado a taurina (TUDCA) están aprobados por la FDA para el tratamiento de la cirrosis biliar primaria. Se ha comprobado que el tratamiento crónico con estos fármacos no produce efectos secundarios (Lindor y cols. 1994, Elia y cols. 2015). En un trabajo reciente, Elia y cols. han demostrado que el TUDCA tiene un efecto beneficioso en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (Elia y cols. 2015).

7. El receptor de las sales biliares

Debido a su similitud estructural con los compuestos esteroideos, las sales biliares son ligandos promiscuos que pueden unirse a varios receptores con diferente afinidad (Baptissart y cols. 2013, Schaap y cols. 2014).

Hay dos receptores de sales biliares a los que se ha prestado una especial atención, porque las cascadas que activan afectan la expresión de un gran número de genes diana, relevantes para el metabolismo de las sales biliares, el colesterol, los lípidos y los carbohidratos, así como genes relacionados con la inflamación, la fibrosis y la carcinogénesis. Estos son el receptor nuclear de Farnesoide X (FXR) y el receptor transmembrana Takeda acoplado a proteínas G (TGR5) (Schaap y cols. 2014).

La sal biliar TUDCA y otras, como el taurolitocolato sódico (TLCA), ejercen su efecto antiinflamatorio principalmente uniéndose al receptor TGR5 (Cipriani y cols. 2011, Yoneno K 2013).

El TGR5 o Gpbar1, es un receptor de membrana con siete dominios transmembrana acoplado a proteínas G (Figura 4). Se sintetiza en el retículo endoplásmico, y posteriormente se transloca a la membrana plasmática, donde es funcional (Spomer L 2013). En condiciones de inflamación su expresión aumenta (Yoneno K 2013). El receptor de las sales biliares se activa tras su unión a estas, se internaliza y transduce las señales mediante la fosforilación y liberación de la subunidad α_s . Esta activa la adenilato ciclasa, generando un aumento en la concentración de AMPc (Maruyama T 2002, Kawamata Y 2003), que activa la quinasa PKA, que a su vez fosforila y activa el factor de transcripción CREB. A nivel fisiológico, el TGR5 regula la composición

de las sales biliares y su liberación en el hígado y la vesícula biliar. Los hepatocitos, las células de Kupffer (macrófagos del hígado) y el endotelio hepático expresan el receptor TGR5. Fuera del hígado, es expresado por los monocitos sanguíneos y en el SN lo expresan los astrocitos y las neuronas (Keitel V 2010, Eggkin HM 2014).

No se conoce la función del TGR5 en el SN, aunque se ha postulado como un posible receptor de neuroesteroides que, debido a su similitud estructural con las sales biliares, lo activan (Keitel V 2010). En un contexto proinflamatorio, la activación del TGR5 desencadena principalmente efectos antiinflamatorios. Lo hace activando varias cascadas celulares que convergen en la inhibición de la liberación de citoquinas inducida por un incremento de AMPc (Cipriani y cols. 2011), la inhibición de NFκB (Pols 2014) y la activación de CREB (Ichikawa R 2012) en monocitos. En las células endoteliales, regula además la producción de nitritos y la inhibición de moléculas de adhesión (Kida T 2013). TGR5 podría, además, activar otras proteínas G heterotriméricas (como las Gq) o el receptor de EGF, responsables a su vez de la activación de la quinasa Akt y de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) en hepatocitos (Dent y cols. 2005, Studer y cols. 2012).

Estas respuestas antiinflamatorias podrían ser beneficiosas en un contexto de inflamación prolongada o daño tisular.

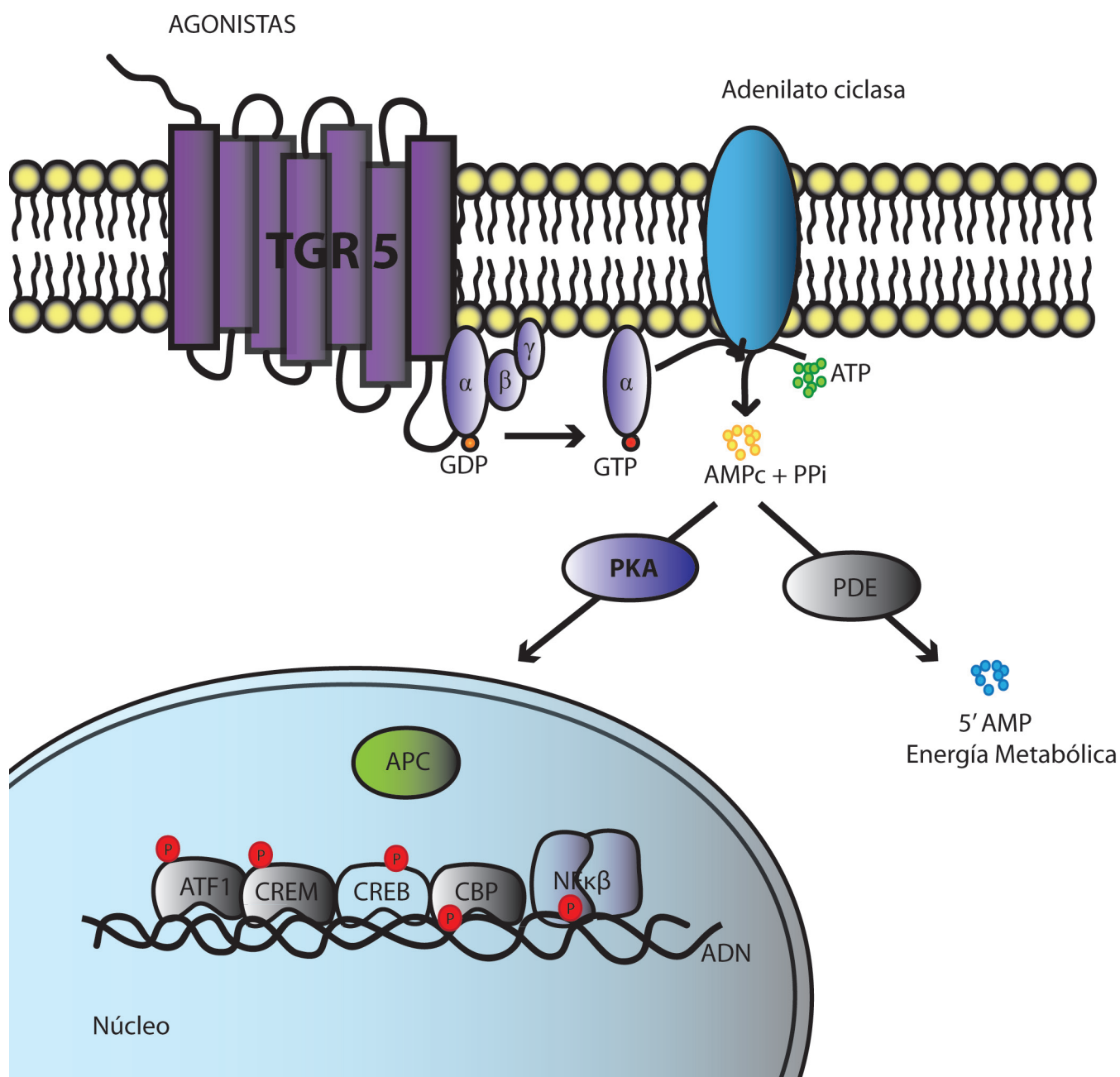


Figura 4. Cascada de activación del receptor TGR5. Tras la unión de un agonista al receptor transmembrana Takeda acoplado a proteínas G (Gpbar1/TGR5) se libera un complejo del receptor, consistente en las subunidades de proteínas G, α , β y γ . Las proteínas intercambiadoras de nucleótidos sustituyen el nucleótido GDP por GTP en la subunidad $G\alpha_s$. La subunidad α_s se libera de las $G\beta$ y $G\gamma$, activando la adenilato ciclasa e induciendo la producción de AMPc a partir de ATP. Esto conduce a la activación de la PKA, que causa la transducción de señales que permiten la translocación de factores de transcripción génica al núcleo celular. Entre estos factores se encuentran ATF1, CREM, CREB, CBP y NFκB. Además, la fosfodiesterasa E (PDE) puede transformar este AMPc en energía metabólica.



OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar y caracterizar el potencial antiinflamatorio de las sales biliares en un modelo de neuroinflamación, determinando su efecto en la activación y diferenciación de las células gliales y en la respuesta inmune.

Objetivos específicos

- 1- Evaluar el papel de la sal biliar TUDCA en el proceso neuroinflamatorio de células gliales, en un modelo de neuroinflamación aguda por inyección intracerebroventricular de lipopolisacárido bacteriano (LPS) en ratones y en cultivos celulares de astrocitos y microglía.
- 2- Caracterizar el fenotipo microglial inducido por el tratamiento con TUDCA en condiciones proinflamatorias, y determinar el efecto neuroprotector de la inhibición de la respuesta inflamatoria de las células gliales por la sal biliar.
- 3- Determinar el efecto de la sal biliar TUDCA sobre la respuesta inmune periférica en un modelo de neuroinflamación aguda.
- 4- Estudiar el efecto de la sal biliar en la activación de la vía del factor de crecimiento antiinflamatorio $TGF\beta$ en el proceso neuroinflamatorio *in vivo*.
- 5- Identificar el receptor y el modo de acción del TUDCA en células de microglía y su implicación en las respuestas celulares a la sal biliar.



MATERIAL Y MÉTODOS

1. **Material**

1.1. **Animales**

- Ratones macho *Mus musculus* de la cepa C57/BL6 (Harlan Interfauna Ibérica, España), de 8-10 semanas de edad.
- Ratones transgénicos SBE/Tk-Luc (Jackson Laboratories, Maine, USA), de 8-10 semanas de edad criados en el animalario del Insituto Cajal, CSIC.
- Ratas Wistar postnatales de 0 a 2 días de edad criadas en el animalario del Instituto Cajal.

1.2. **Reactivos**

1.2.1. Para tratamientos *in vivo*

- Lipopolisacárido de *E. coli* isotipo 055:B5 (Sigma-Aldrich Saint Louis, MO, EE.UU.).
- Heparina sódica Chiesi (CHIESI ESPAÑA S.A., Madrid, España).

1.2.2. Para la detección de bioluminiscencia

- D- Luciferina (Caliper, Madrid, España).
- IsoFlo® (Isoflurano, Esteve Veterinaria, España).

1.2.3. Para cultivos celulares

- ADNasa (Roche; Indianapolis, IN, EE.UU.).
- Medio “Dulbecco’s Modified Eagle’s Media” (DMEM, Lonza Ibérica S.A. Barcelona, España).
- Medio “Dulbecco’s Modified Eagle’s Media” sin rojo fenol (DMEM sphr, Sigma-Aldrich Co., ST Louis, MO, EE.UU.).
- Medio “Roswell Park Memorial Insitute 1640” (RPMI 1640, Sigma-Aldrich Co., ST Louis, MO, EE.UU.).
- Medio Neurobasal™ (Gibco-Invitrogen S.A., Barcelona, España).
- Medio Opti-MEM® (Gibco-Invitrogen S.A., Barcelona, España).
- GlutaMAX™ (Gibco-Invitrogen S.A., Barcelona, España).
- Medio Hank’s (HBSS, Hanks’s Balanced Salt Solution, Sigma-Aldrich Co., ST Louis, MO, EE.UU.)
- Penicilina/Estreptomicina (P/S, Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).

- Poli-L-Lisina (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- Suero Fetal Bovino (FBS, Gibco-Invitrogen S.A., Barcelona, España).
- Suero de Caballo (HS, Gibco-Invitrogen S.A., Barcelona, España).
- Tripsina (Sigma-Aldrich Co., ST Louis, MO, EE.UU.).

1.2.4. Para tratamientos *in vitro*

- Forskolina (Sigma-Aldrich Saint Louis, MO, EE.UU.).
- Interferón gamma humano (IFN γ , Peprotech, Londres, Reino Unido).
- IL-4 recombinante de rata (Peprotech, Londres, Reino Unido).
- IL-13 recombinante de rata (Peprotech, Londres, Reino Unido).
- Lipopolisacárido de *E. coli* isotipo 026:B6 (Sigma-Aldrich Saint Louis, MO, EE.UU.).
- Rp-Adenosina 3',5'-monofosforotioato trietilamonio sal hidrato (Rp-cAMPS, Sigma-Aldrich Saint Louis, MO, EE.UU.).
- Sal sódica del Ácido Tauroursodeoxicólico (TUDCA, Calbiochem, La Jolla, EE.UU.).

1.2.5. Para inmunocitoquímica e inmunohistoquímica

- Dako Pen (DAKO Denmark A/S, Dinamarca).
- DePeX® (AMS Biotechnology, Oxon, Reino Unido).
- 3,3-Diaminobenzidina tetrahidrocloruro (Sigma-Aldrich Química, S. A., Madrid, España).
- Etanol (MERK KGaA, Darmstadt, Alemania).
- Fluoromount-G T (EMS, Hatfield, PA, EE.UU.).
- Peróxido de hidrógeno (Sigma-Aldrich Química, S. A., Madrid, España).
- Suero normal de caballo (HS, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EE.UU.).
- Suero normal de cabra (NGS, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EE.UU.).
- Tritón X-100 (Sigma-Aldrich Química, S. A., Madrid, España).
- Tween 20 (MERK KGaA, Darmstadt, Alemania).

1.2.6. Para el procesamiento del tejido

- Paraformaldehído (MERCK, Darmstadt, Alemania).
- Sacarosa (MERCK, Darmstadt, Alemania).
- Tissue-Tek® (Sakura Finetek Europe, Alphen ann den Rijn, Holanda).

1.2.7. Para ensayos in vitro

- Array comercial de citoquinas Quantibody® Rat Cytokine Array 3 Detection Antibody Cocktail (RayBiotech Inc., Atlanta, EE.UU.).
- Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE.UU.).
- Dimetil sulfóxido, DMSO (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE.UU.).
- 1x Passive Lysis Buffer (Promega, Madison, WI, EE.UU.).
- Insertos para placas o Transwells de tamaño de poro de 0,4 o 8 µm (Corning, San Dimas, CA, EE.UU.).
- Reactivo de Griess modificado (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE.UU.).

1.2.8. Para la inmunodetección por separación electroforética de proteínas (Western Blot)

- Acrilamida (Sigma-Aldrich Saint Louis, MO, EE.UU.).
- APS (Persulfato amónico, Sigma-Aldrich Saint Louis, MO, EE.UU.).
- Dodecil Sulfato Sódico (SDS, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE.UU.).
- Inhibidor de fosfatasas "PhosSTOP" (Roche Diagnostics, S.L., Mannheim, Alemania).
- Inhibidor de proteasas "cOmplete Mini" (Roche Diagnostics, S.L., Mannheim, Alemania).
- Membrana de transferencia de Nitrocelulosa "Nitrocellulose Transfer membrane PROTRAN®" (Whatman GmbH, Alemania).
- TEMED (Fluka, Sigma-Aldrich Saint Louis, MO, EE.UU.).
- Tris Base (Sigma-Aldrich Saint Louis, MO, EE.UU.).

1.2.9. Para la extracción de ARN, transcripción inversa (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

- ADNasa I libre de ARNasas (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., Madrid, España).

- Kit de síntesis de la primera hebra de ADNc “RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit” (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., Madrid, España).
- Master mix “Power SYBR® Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems, Life Technologies, Warrington, Reino Unido).
- TRIzol® (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., Madrid, España).

1.2.10. Para la transfección de plásmidos reporteros

- Lipofectamine® 2000 (Invitrogen, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., Madrid, España).
- X-tremeGENE HP (Roche Diagnostics, Barcelona, España).
- X-tremeGENE 9 (Roche Diagnostics, Barcelona, España).

1.3. Equipos

- Agitador de células (Infors Minitron Botmingen, Suiza).
- Campana de flujo laminar (Staril, Mazzo di Rho, Italia).
- Centrífuga 5415R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).
- Criostato (Leica Microsystems CM1900, Barcelona, España).
- Escáner Bio-Rad GS-810 (BIO-RAD Labs, Richmond, CA, EE.UU.).
- Equipo electroforético (BIO-RAD Labs, Hercules, CA, EE.UU.).
- Incubador (RS Biotech Galaxy S, Escocia, Reino Unido).
- Luminómetro de tubo Sirius (Berthold, Bad Wildbad, Alemania).
- Microscopio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Alemania).
- Microscopio óptico y de fluorescencia Olympus Provis AX70, acoplado a un sistema fotográfico Olympus PD50 (Olympus Optical Co. (Europa) GMBH, Hamburgo, Alemania).
- Multiskan Ascent (Thermo Electron Co., Shanghai, China).
- Sistema de transferencia Cubeta Hoefer TE22 (Hoefer Inc., Holliston, MA, EE.UU.).
- Sistema de imagen *in vivo* (In Vivo Imaging System, IVIS Lumina, Xenogen, Alameda, CA, EE.UU.).
- Sistema 7500 Real Time PCR System de PCR Cuantitativa (Applied Biosystems, Madrid, España).
- Sonicador (Sonics & Materials Inc, Vibra Cell, Danbury, CT, EE.UU.).
- Termociclador (T3 Thermocycler, Biometra, Goettingen, Alemania).

1.4. Anticuerpos

Anticuerpo para citometría de flujo	Localización celular	Huésped	Distribuidor	Dilución empleada
CD4-FITC	Superficie	Clone GK1.5	eBioscience	1:400
CD11b-APC	Superficie	Clone M1/70	eBioscience	1:400
CD16/CD32	Superficie	Rata	BD Pharmingen	1:1000
CD45-PercPCy5.5	Superficie	Ratón	eBioscience	1:800
Fixable Viability Dye eFluor® 780	Intracelular	Clone XMG1.2	eBioscience	1:1000
Foxp3-PE	Intracelular	Conejo	R&D Systems	1:100
IgG IsoControl APC	-	Hámster	eBioscience	1:500
IgG2b κ Iso Control PE	-	Rata	eBioscience	1:500
CD16/CD32	Superficie	Rata	BD Pharmingen	1:1000

Tabla 2. Anticuerpos para citometría de flujo. En la tabla se recoge el nombre del anticuerpo y el fluoróforo al que está conjugado (APC- Apocianina, FITC- Fluorescein Isotiocianato 1, PE- Ficoeritrina, PercPCy5.5- Proteínas de Peridinin Clorofilas conjugadas a cianina 5.5), la localización celular del epítipo que reconoce cada anticuerpo, el huésped en el que está hecho el anticuerpo, el distribuidor comercial y la dilución de trabajo empleada para el procedimiento experimental.

	Anticuerpo (IHQ o ICQ)	Marcaje	Huésped	Distribuidor	Dilución de trabajo
Anticuerpos Primarios	Arginasa 1 (V-20)	Microglía M2	Cabra	Santa Cruz Biotechnology	1:200
	β -III-Tubulina	Neuronas	Conejo	Abcam	1:2000
	CD11b	Microglía	Ratón	BD Pharmingen	1:250
	CD16/CD32	Microglía M1	Rata	BD Pharmingen	1:400
	Colágeno tipo IV	Células endoteliales	Conejo	Abcam	1:200
	Iba-1	Microglía	Conejo	WAKO	1:2000
	Iba-1 / AIF 1	Microglía	Cobaya	Synaptic Systems	1:500
	GFAP (096)	Astrocitos	Conejo	DAKO	1:2000
	GPRC / TGR5	Receptor TGR5	Conejo	Abcam	1:100
	TGF β_3		Ratón	Iowa Hybridoma Bank	1:500
	VCAM-1 (P3C4)	Molécula de Adhesión Vascular 1	Ratón	Iowa Hybridoma Bank	1:500
	Hoechst	Nuclear			1:5000
Anticuerpos Secundarios	Alexa 594 anti- cabra		Burro	Invitrogen Molecular Probes	1:2000
	Alexa 488 anti- cobaya		Cabra	Life Technologies	1:500
	Alexa 488 anti- IgG de conejo		Cabra	INVITROGEN Molecular Probes	1:2000
	Alexa 488 anti- ratón		Cabra	Invitrogen Molecular Probes	1:1000
	Alexa 594 anti- IgG de conejo		Cabra	INVITROGEN Molecular Probes	1:1000
	Alexa 594 anti- rata		Cabra	INVITROGEN Molecular Probes	1:2000
	Biotinilado anti- cabra		Burro	Jackson Immunoresearch	1:200
	Biotinilado anti- conejo		Cabra	Jackson Immunoresearch	1:200
	Biotinilado anti- ratón		Cabra	Jackson Immunoresearch	1:200

Tabla 3. Anticuerpos empleados para técnicas de inmunohistoquímica o inmunocitoquímica.

En la tabla se recoge el nombre del anticuerpo, si es primario o secundario, a qué epítipo se une, el huésped en el que se ha producido, el distribuidor comercial y la dilución de trabajo empleada para el procedimiento experimental.

Anticuerpo para western blot	Tipo	Huésped	Distribuidor	Dilución empleada	Masa Molecular (KDa)
α -Actinina	1	Ratón	BD Biosciences	1:5000	105
Fosfo-eIF2 α	1	Conejo	Abcam	1:500	36
Fosfo-NF κ B p65 (Ser536)	1	Conejo	Cell Signaling	1:1000	65
Fosfo-PKR (Thr451)	1	Conejo	Sigma-Aldrich	1:500	65
GAPDH	1	Ratón	Millipore	1:500	36
GPRC / TGR5	1	Conejo	Abcam	1:1000	33
iNOS/NOS2	1	Conejo	BD Biosciences	1:4000	130
NF κ B p65	1	Conejo	Cell Signaling	1:1000	65
Conjugado a HRP anti-conejo	2	Cabra	Jackson ImmunoResearch	1:2000	
Conjugado a HRP anti-ratón	2	Cabra	Jackson ImmunoResearch	1:2000	

Tabla 4. Anticuerpos empleados para western blot. En la tabla se recoge el nombre del anticuerpo, el tipo: 1- Primario, 2- Secundario, el huésped en el que se ha producido, el distribuidor comercial, la dilución de trabajo empleada para el procedimiento experimental y la masa molecular de la proteína que marca cada anticuerpo.

1.5. Cebadores para PCR cuantitativa

Los cebadores para la cuantificación de la expresión del ARNm mediante PCR cuantitativa fueron diseñados con el programa “Primer Express” de Applied Biosystems (Reino Unido), a partir de las secuencias génicas recogidas en la base de datos del NCBI (EE.UU.). Se utilizó el programa GeneRunner para la identificación de las estructuras secundarias de los cebadores y de las interacciones intramoleculares. Se seleccionaron los cebadores con las menores estructuras secundarias e interacciones intramoleculares.

- Para amplificación de ARNm de rata (ensayos *in vitro*)

Gen	Número de acceso	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')	Tamaño amplicón
Arg 1	NM_017134.3	gcagagaccagaagaatggaac	cggagtgttgatgtcagtgtgagc	144
CD200R1	NM_023953.1	cataggatgcattgtcttttga	gctgcatttcctcctcaata	98
C/EBPβ	NM_024125.5	cgcaacacacgtgtaactgtc	aacaaccccgaggaaacat	67
DUSP1	NM_053769.3	gcgcgctccactcaagtc	gggcaggaagccgaaac	62
GPBAR1/ TGR5	NM_177936.1	aaaggtggctacaagtgttc	ttcaagtccaagtcaagtgtg	109
IL-4	NM_201270.1	ccacggagaacgagctcatc	gagaacccagactgtgtctca	101
IL-4Rα	NM_133380.2	gatcttctgagcccggtga	ctctccgctgtgcatt	59
IL-10	NM_012854.2	gatgcccaggcagagaa	cccagggaattcaaagtct	57
IL-12β	NM_022611.1	cgagactctgagccactcatc	gtggaccaaattccattttcc	60
IL-13	NM_053828.1	gtggccctcaggagcttat	ctgtcaggtccacgtccat	100
iNOS	NM_012611.3	acattgatctccgtgacagcc	ccctcaatggtgtgacatg	158
IRAK-M	NM_001108101.1	caatgggacacttttcgacaga	gattcgaacgtgccaggaa	70
MCP-1	NM_031530.1	tgctgtctcagccagatgcagta	tacagcttcttgggacacctgct	131
MHCII	NM_013069.2	ttccagccccatgtcag	acaacccagggcacaga	54
PD-L1	NM_001191954.1	caacgtccataccgcaa	catgctcagaagtggctggat	62
Sphk1	NM_001270811.1	acgtgcgggggtgtcaa	catatgcttgccttctgca	67
TGFβ_1	NM_021578.2	ccagccgcgggactct	ttccgttcaccagctccat	58
TGFβ_2	NM_031131.1	cagaaaactataaagtccactagg aaaaaa	ggcaacaacattagcaggagatg	71
TGFβ_3	NM_013174.2	tgccccctctacattg	ggttcgtggaccatttcc	58
36B4	NM_022402.2	ttccactggctgaaaaggt	cgcagccgaaatgc	59
β-actina	NM_031144.3	tccgtaaagaccttatgc	atcttcatggtgctaggagc	114

Tabla 5. Secuencias de los cebadores de rata para amplificación de ARNm. En la tabla se recoge el nombre del gen, su número de acceso en la base de datos del NCBI (EE.UU.), las secuencias de los cebadores sentido y antisentido (en dirección 5'-3'), y el tamaño del amplicón resultante.

- Para la amplificación de ARNm de ratón (ensayos *in vivo*)

Gen	Número de acceso	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')	Tamaño amplicón
Arg1	NM_007482.3	gcagagaccagaagaatggaac	cggagtgtgatgtcagtgtgagc	144
CD200R1	NM_021325.3	cataggatgcatttgtctttgaaa	gctgcatttcacacctctcaata	98
DUSP-1	NM_013642.3	gcgcgctccactcaagtc	gggcaggaagccgaaaac	62
Foxp3	NM_001199348.1	ttggccagcgccatctt	tgctcctccagagagaagtg	110
IL-1β	NM_008361.3	ctggtgtgacgttccatta	ccgacagcacgaggcttt	74
IL-4	NM_021283.2	tcctcacagcaacgaagaaca	agcaccttgaagccctaca	61
IL-4Rα	NM_001008700.3	gctgtcctccgctcagtt	ggcagtgactttgggcaatc	64
IL-10	NM_010548.2	gatgccccaggcagaga	cccaggaattcaaagtct	57
IL-12β	NM_008352.2	cgagactctgagccactcacat	gtggaccaaattccattttcc	60
IL-13	NM_008355.3	agaccagactcccctgtgca	tgggtcctgtagatggcattg	123
MCP-1 (CCL-2)	NM_011333.3	cccactcacctgctact	tctggaccattccttcttg	164
MHCII	NM_0110378.2	ttccagccccatgtcag	acaacccaggggcacaga	54
MIP-1α (CCL-3)	NM_011337.2	actgacctggaactgaatgcctga	atgtggctacttggcagcaaacag	157
PD-L1	NM_021893.3	caggccgagggttatcca	cgggttggtggtcactgttt	58
RANTES (CCL-5)	NM_013653.3	tcgtgcccacgtcaaggagtattt	tcttctctgggttggcacacactt	107
RPS29	NM_009093.2	gccgcgtctgtcctcaa	acatgttcagcccgtatttgc	54
Sphk1	NM_011451.3	acgtgcgggggtgtcaa	catatgcttgcccttctgca	67
TGFβ₁	NM_011577.1	ccagccgcgggactct	ttccgttccaccagctccat	56
TGFβ₂	NM_009367	ccacctcccctccgaaa	gagagcatcaaaagcggacgatt	60
TGFβ₃	NM_009368.3	ctgtccacttgaccacggt	cctaattggcttcaccctctt	63

Tabla 6. Secuencias de los cebadores de ratón para amplificación de ARNm. En la tabla se recoge el nombre del gen, su número de acceso en la base de datos del NCBI (EE.UU.), las secuencias de los cebadores sentido y antisentido (en dirección 5'-3'), y el tamaño del amplicón resultante.

1.6. Plásmidos reporteros

Plásmido reportero	Tiempo de incubación	Características	Obtenido de:
CRE-Luc	6 h	21 repeticiones de los elementos de respuesta a AMPc	Dr. W. Born (Departments of Orthopedic Surgery and Medicine, Universidad de Zurich, Zurich, Suiza)
IL-4-Luc	24 h	Promotor de -804 a -3 del sitio de comienzo de transcripción del gen murino de la IL-4	(Plásmido Addgene N° 12195) (Szabo y cols. 1993)
iNOS-pGL3-Luc	24 h	Fragmento de 720 pb desde la región que flanquea en 5' el promotor de la iNOS de rata	(Saura y cols.1998)
NFκB -pGL3-Luc	6 h	Fragmento de los pares de bases -241 to -54 de la región flanqueante 5' del sitio de unión de NFκβ del promotor de la E-selectina humana.	(Plásmido Addgene N° 13029) (Chow y cols 1999)
pSV40-RL			Promega, Madison, WI, EE.UU.

Tabla 7. Plásmidos reporteros empleados en la transfección celular. En la tabla se recoge el nombre del plásmido, si se detecta mediante luciferina (-Luc) o renilla (-RL), el tiempo de incubación con el tratamiento, las características del plásmido y la fuente de la que fue obtenido.

2. Métodos Experimentales

2.1. Animales

La experimentación *in vivo* se realizó con ratones macho *Mus musculus* de la cepa C57/BL6 (Harlan Interfauna Ibérica, Barcelona, España), de 8-10 semanas de edad, y con ratones transgénicos SBE/Tk-Luc de una colonia propia, adquiridos inicialmente de Jackson (Jackson Laboratories, Maine, EE.UU.).

Los animales se mantuvieron en las instalaciones del animalario del Instituto Cajal (CSIC) durante el procedimiento, con comida y agua *ad libitum*, en condiciones de temperatura y humedad controladas (22°C y 50±10% humedad relativa), con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h. Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo siguiendo las Guías de la Comunidad Europea (86/609/EU) y siguiendo la regulación española vigente (RD1201/2005) para la manipulación animal, y fueron aprobados por el Comité Ético y Científico del Instituto Cajal, CSIC y del Hospital Nacional de Paraplégicos, SESCAM.

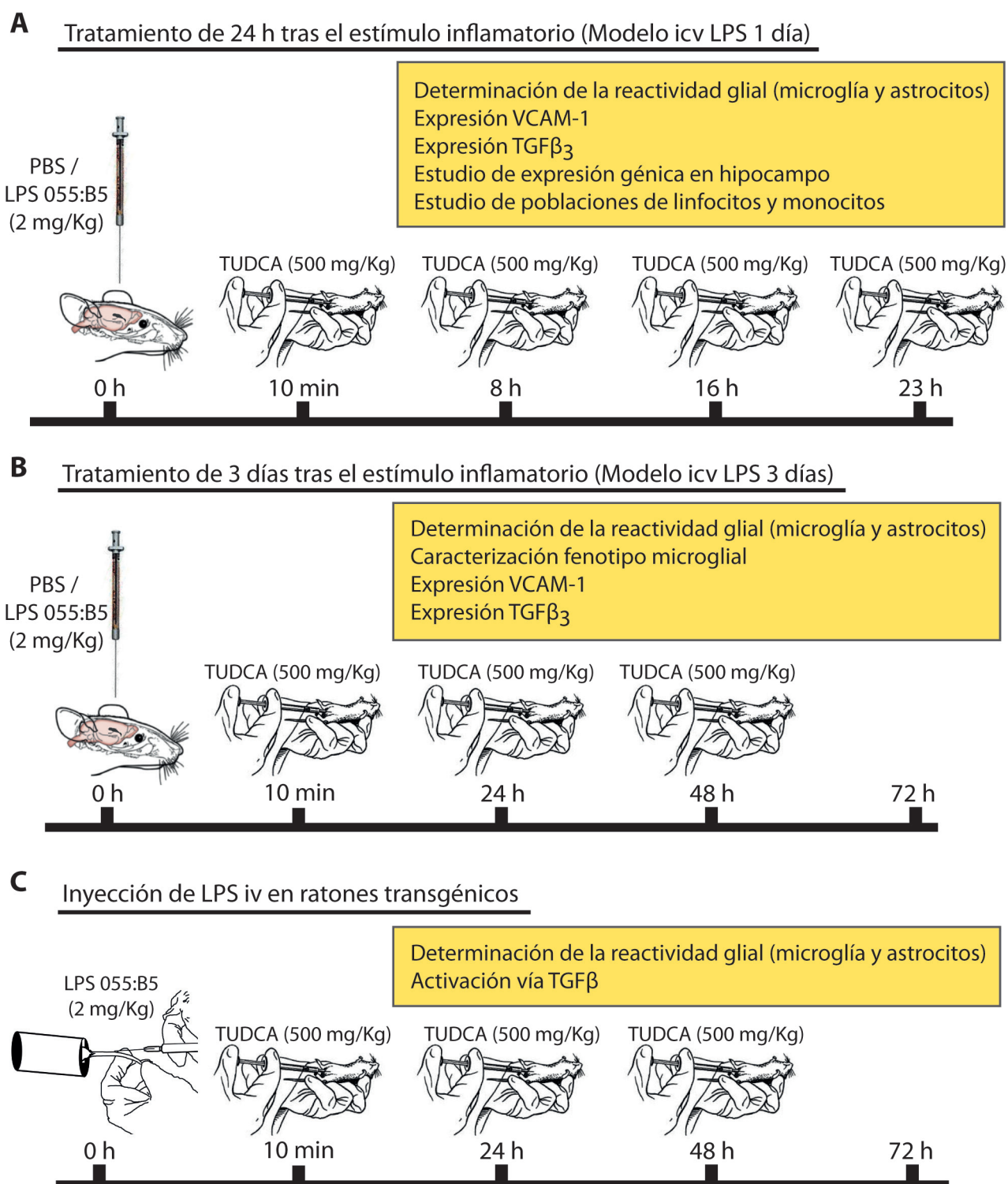


Figura 5. Esquema de procedimientos experimentales *in vivo*. A) En el procedimiento de inyección icv LPS de 1 día, la endotoxina fue inyectada en el ventrículo izquierdo de los ratones y los grupos experimentales que recibían tratamiento con TUDCA (500 mg/Kg) recibieron una inyección ip cada 8 h. Estos ratones fueron empleados para la determinación de la reactividad glial, de la expresión de VCAM-1 y de TGF β_3 , para el estudio de la expresión génica en hipocampus y para la determinación de poblaciones de monocitos y linfocitos. B) En el ensayo icv LPS de 3 días, se administró TUDCA ip (500 mg/Kg) a los grupos experimentales correspondientes cada 24 h. Estos ratones se emplearon para la determinación de la reactividad glial, la expresión de VCAM-1 y de TGF β_3 y la caracterización del fenotipo microglial. C) En el modelo de iv de LPS en ratones transgénicos, se midió la actividad luciferasa basal de los ratones y posteriormente se les inyectó LPS iv. Al grupo experimental con tratamiento de TUDCA ip se le inyectó TUDCA (500 mg/Kg) cada 24 h en el flanco contralateral al que se inyectaba la luciferina. Estos ratones se emplearon para el estudio de la activación de la vía del TGF β y la determinación de la reactividad glial.

2.1.1. Inyección intracerebroventricular de LPS

La administración del LPS en el SNC de ratones *Mus musculus* C57/BL6 se realizó mediante una inyección icv de 5 µL del isotipo 055:B5 a una concentración de 2 mg/Kg en PBS (Figura 5A-B), en las coordenadas estereotáxicas AP: -0.46, ML: -1.0, y DV: -1.8 desde Bregma (Paxinos 1997).

2.1.2. Inyección intravenosa de LPS

La inyección intravenosa de LPS, disuelto en PBS y Heparina (1:1), se realizó en la vena de la cola en los ratones transgénicos SBE/TK-Luc, a una concentración de 2 mg/Kg, y un volumen final de 100 µL (Figura 5C).

2.1.3. Tratamientos con la sal biliar TUDCA *in vivo*

Tras la inyección icv de LPS se procedió a la inyección ip de TUDCA (500 mg/Kg) cada 8 h en los ratones que iban a ser sacrificados a las 24 h, o cada 24 h en los que iban a ser sacrificados a los 3 días.

2.1.4. Detección de la bioluminiscencia en los ratones SBE/Tk-Luc

Los ratones SBE/Tk-Luc expresan un transgen que contiene 12 repeticiones del sitio de unión de los factores de transcripción Smad2/3 acopladas al promotor de la luciferasa de luciérnaga. De esta manera, la activación de Smad2/3 (y en consecuencia la activación de la ruta de TGFβ) es proporcional a la actividad luciferasa.

La bioluminiscencia basal de cada ratón fue determinada antes del procedimiento experimental y a las 24, 48 y 72 h tras la inyección iv de LPS, con o sin tratamiento ip con TUDCA, con un aparato In Vivo Imaging System (IVIS Lumina, Xenogen, Alameda, CA, EE.UU.). Para ello inyectamos ip 150 mg/Kg de D-Luciferina (Caliper, Madrid, España) 10 minutos antes de la adquisición de las imágenes. Los ratones permanecieron anestesiados con isoflurano durante la adquisición de las imágenes. Se realizaron mediciones sucesivas de la bioluminiscencia cada 5 minutos, y las mediciones fueron representadas como la emisión de fotones por segundo por centímetro cuadrado por estereorradián en un área idéntica para todos los ratones estudiados. Obtuvimos una imagen superpuesta de toda la luminiscencia obtenida en ese tiempo con el programa LIVINGIMAGE Software overlay (Xenogen, Grantham, Reino Unido), en la que la intensidad de luminiscencia se marcó con diferentes intensidades de color (siendo la menor intensidad en color azul y la máxima en rojo). Los datos obtenidos se relativizaron a la luminiscencia basal para cada ratón obtenida al realizar el procedimiento. Los resultados se presentaron como incremento respecto de la luminiscencia basal del individuo.

2.1.5. Procesado del tejido

Los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico intraperitoneal (50 mg/Kg), y se perfundieron con 60 mL de suero salino y 60 mL de paraformaldehído (PFA) al 4% en PB 0,1 M, pH 7,4.

Los cerebros destinados a inmunohistoquímica fueron extraídos y post-fijados durante 24 h en PFA 4% a 4°C, y otras 48 h en Sacarosa al 30%, a 4°C. Posteriormente se incluyeron en OCT™ Compound y se cortaron en secciones de 15 µm de grosor, en un criostato LEICA CM1900, que se recogieron en portaobjetos gelatinizados y se conservaron a -20°C hasta su uso. Los cerebros destinados al análisis de la expresión de ARNm en los hipocampos fueron extraídos y se diseccionó el hipocampo ipsilateral, para su posterior congelación y procesamiento. El hemisferio contralateral fue procesado para su análisis inmunohistoquímico.

2.1.6. Inmunohistoquímica

a) Marcaje con Diaminobenzidina (DAB)

Las secciones de cerebro se lavaron con PB durante 10 minutos, se permeabilizaron con PBS + Tween 20 al 0,5% (6 lavados de 5 minutos cada uno) y se lavaron 2 veces durante 10 minutos con PBS + Tween 20 al 0,1% (PBS-T). Tras los lavados, se inhibió la actividad peroxidasa endógena del tejido mediante la incubación con metanol 1% y peróxido de hidrógeno 1% en PBS-T y se lavaron de nuevo (6 lavados de 10 minutos con PBS-T). Después, se procedió al bloqueo de uniones inespecíficas mediante la incubación de las secciones durante 1 h a temperatura ambiente con una solución al 5% con el suero del animal en el que se ha producido el anticuerpo secundario (Solución de Bloqueo). A continuación se lavaron los cortes con PBS-T y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluido en Solución de Bloqueo, durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavó el exceso de anticuerpo primario con PBS-T y se incubaron las secciones con el anticuerpo secundario durante 90 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar el exceso de anticuerpo secundario con PBS-T, se incubaron los cortes con avidina-peroxidasa durante 45 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras 6 lavados de 10 minutos con PBS, se revelaron las secciones con DAB (Diaminobenzidina al 0.025% y H₂O₂ al 0,003% en PB). Cuando la reacción fue visible se paró lavando las secciones repetidas veces con PB. Posteriormente, las secciones fueron secadas a temperatura ambiente y montadas con cubreobjetos sobre DePeX®.

b) Inmunofluorescencia

Las secciones de tejido se lavaron con PB durante 10 minutos, se permeabilizaron con PBS + Tween 20 al 0,5% (6 lavados de 5 minutos cada uno) y se lavaron 2 veces

durante 10 minutos con PBS + Tween 20 al 0,1% (PBS-T). Tras los lavados, se inhibió la actividad peroxidasa endógena del tejido mediante la incubación con metanol 1% y peróxido de hidrógeno 1% en PBS-T, seguido por nuevos lavados (6 lavados, de 10 minutos cada uno, con PBS-T). Después, se bloquearon las uniones inespecíficas incubando las secciones durante 1 h a temperatura ambiente con Solución de Bloqueo. A continuación, las secciones fueron lavadas con PBS-T e incubadas con el anticuerpo primario, o la mezcla de anticuerpos primarios correspondientes, durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, el exceso de anticuerpo primario fue eliminado con PBS-T y fueron incubadas con el anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo durante 1 h 30 minutos. Tras lavar el exceso de anticuerpo secundario con PBS, los cortes fueron incubados con el marcador nuclear Hoechst 33258 durante 5 minutos. Posteriormente, se realizaron 6 lavados con PB, de 10 minutos cada uno y las secciones fueron secadas al aire y montadas con cubreobjetos sobre Fluoromount-G T de SouthernBiotech.

c) Controles de especificidad

La especificidad del marcaje inmunohistoquímico, tanto para el marcaje con DAB como para el de inmunofluorescencia, se realizó midiendo el marcaje de una sección cerebral, procesada de igual manera que el resto de secciones de ese individuo, con la salvedad de que no fue incubada con el anticuerpo primario. Cuando las secciones se emplearon para el estudio de colocación de marcadores fluorescentes se realizó el control de cada uno de los anticuerpos secundarios para ese tejido, además de la mezcla de ellos, para establecer el fondo propio de los mismos y de la mezcla.

2.1.7. Extracción de ARNm de hipocampos

Para analizar la expresión génica *in vivo*, los hipocampos ipsilaterales a la inyección icv de LPS en ratones C57/BL6, fueron disecados 1 día tras la inyección. Se lavaron con PBS, se disgregaron en TRIzol con un homogeneizador mecánico y se mantuvieron congelados a -80°C hasta el momento de extracción del ARNm (ver apartado 2.5).

2.2. Cultivos primarios de células gliales

2.2.1. Preparación de cultivos primarios de microglía

Los cultivos primarios de microglía se obtuvieron a partir de cultivos mixtos de las cortezas cerebrales de ratas Wistar postnatales P0-P2, según las modificaciones del protocolo de McCarthy y de Vellis (McCarthy and de Vellis 1980) realizadas por Mecha y colaboradores (Mecha M 2011). Brevemente, se extrajo el encéfalo de las ratas, se colocó en DMEM frío y se retiraron las meninges, el tronco encefálico y los bulbos

olfativos. Las cortezas se disgregaron mecánicamente con una pipeta Pasteur de vidrio recubierta con suero, se centrifugaron 10 minutos a 1050 rpm, se resuspendieron en DMEM 10:10:1 (DMEM con 10% Suero Fetal Bovino, 10% Suero de Caballo y 1% Penicilina/Estreptomicina) y se sembraron en frascos de 75 cm² previamente cubiertos con poli-L-Lisina (10 µg/mL) a razón de un hemisferio por frasco. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂.

Después de 7-10 días de realizar el cultivo, se podían observar las diferentes poblaciones del cultivo mixto: una monocapa confluyente de astrocitos cubriendo la base, sobre la que se podía identificar una población de oligodendroglía adherida a ellos y células microgliales en flotación en el medio o débilmente adheridas a la monocapa de astrocitos. La obtención de la población de células microgliales se realizó mediante la agitación de los frascos a 230 rpm a una temperatura de 37°C durante 3 h en un agitador (Infors Minitron Botmingen, Suiza). Tras esto, se centrifugó el medio que contenía la suspensión de células microgliales y se sembró la microglía con una densidad de 200.000 células/cm².

2.2.2. Preparación de cultivos primarios de astrocitos

Los cultivos primarios de astrocitos se obtuvieron a partir de cultivos mixtos de cortezas cerebrales de ratas Wistar como se ha descrito en el apartado anterior. Tras la obtención de la microglía, se agitaron los cultivos mixtos a 280 rpm a 37°C durante una noche. Tras esto se descartó el sobrenadante, se lavó la monocapa de astrocitos con PBS y se tripsinizó con Tripsina 0,25%, EDTA 0,1%. Los astrocitos se sembraron en placas de cultivo con una densidad de 30.000 células/cm².

2.2.3. Inmunocitoquímica

La microglía se sembró sobre cubreobjetos de cristal recubiertos con poli-L-lisina (50 µg/mL) a una densidad de 20.000 células por pocillo. Tras 48 h se fijaron con PFA 4% y se lavaron con PBS.

Para determinar la expresión del receptor TGR5 en cultivos microgliales, las células se trataron con un protocolo de exposición de antígeno con tampón citrato durante 30 minutos (citrato sódico 10 mM, 0,05% Tween 20, pH 6,0). Las células se lavaron con PBS, y las uniones no específicas fueron bloqueadas por incubación durante 1 h con NGS 5% y BSA al 0,1% en PBS a temperatura ambiente. A continuación, las células se incubaron con el anticuerpo primario a 4°C toda la noche. Tras esto, se lavaron con PBS y se incubaron 90 minutos con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado a Alexa. Posteriormente se lavaron con PBS-T, se incubaron con Hoechst 33342 para marcar los núcleos, se lavaron con PBS y se montaron sobre portaobjetos con Fluoromount-G T y se visualizaron en un microscopio confocal Leica TCS-SP5.

2.2.4. Determinación de la producción de nitritos.

La actividad de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) se estimó midiendo la acumulación de nitritos en el sobrenadante de las células tratadas (Green, Wagner et al. 1982). La microglía se estimuló con LPS 026:B6 (200 ng/mL) y los astrocitos con LPS (1 µg/mL) e IFN γ (20 ng/mL) durante 24 h. Para ambos tipos celulares, se pretrató un grupo con TUDCA 200 µM durante 2 h. Los sobrenadantes se mezclaron con el reactivo de Griess modificado en proporción 1:1, se agitaron, y se determinó su absorbancia a λ_{492} en un equipo Multiskan.

La producción de nitritos se calculó relativizando los valores de absorbancia obtenidos a la viabilidad celular.

2.2.5. Ensayos de viabilidad celular

Tras realizar los tratamientos pertinentes, las células se incubaron durante 3 h a 37°C con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) disuelto en DMEM o RPMI sin rojo fenol a una concentración de 0,5 µg/mL. Tras la incubación, el medio fue retirado y se añadieron 100 µL de DMSO en cada pocillo, se agitó y se midió la absorbancia a λ_{595} en el equipo Multiskan.

2.2.6. Ensayos de proliferación de microglía

Para determinar el efecto del TUDCA en la proliferación de la microglía, las células (20.000 por pocillo) se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertas con poli-L-lisina 10 µg/mL. Al día siguiente se pretrataron durante 2 h con concentraciones crecientes de TUDCA desde 4 a 500 µM, y LPS (10 ng/mL) en medio RPMI suplementado con 5% FBS y 1% P/S. Tras 48 h la proliferación celular se determinó mediante el ensayo de viabilidad celular MTT, como ha sido descrito anteriormente.

2.2.7. Determinación de los niveles de AMPc

El efecto del tratamiento con TUDCA en la producción de AMPc se determinó sembrando 50.000 células de microglía o 20.000 astrocitos en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Tras 24 h, las células se trataron con TUDCA y/o LPS (o LPS e IFN γ en el caso de los astrocitos) durante 3 h o 6 h. Posteriormente se midió la producción de AMPc en los sobrenadantes con el kit comercial cAMP Direct Immunoassay (Abcam, Reino Unido), extrapolando el valor de absorbancia a λ_{450} a una curva patrón y se relativizó este valor al número total de células recuperadas en cada pocillo.

2.2.8. Determinación de la secreción de citoquinas

Se determinó la secreción de citoquinas por las células microgliales con el array comercial de citoquinas Quantibody® Rat Cytokine Array 3 Detection Antibody

Cocktail (RayBiotech, Inc.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células sembradas en cada pocillo (2×10^6) se pretrataron con TUDCA (200 μ M) y se incubaron con LPS (200 ng/mL) durante 6 h o 24 h. Después, se concentraron los sobrenadantes con filtros Nanoseph 3K OMEGA, de Pall Life Sciences. Tras atemperar los chips, se incubaron las muestras y los estándares sobre el microchip a 4°C toda la noche. Se lavaron y se incubaron 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo de detección. Una vez lavado el exceso de anticuerpo, se incubaron con un anticuerpo conjugado a estreptavidina 1 h a temperatura ambiente. Tras su lavado y secado, los chips se conservaron a 4°C hasta su lectura en la Unidad de Genómica del Campus Moncloa de la Universidad Complutense de Madrid (UCM).

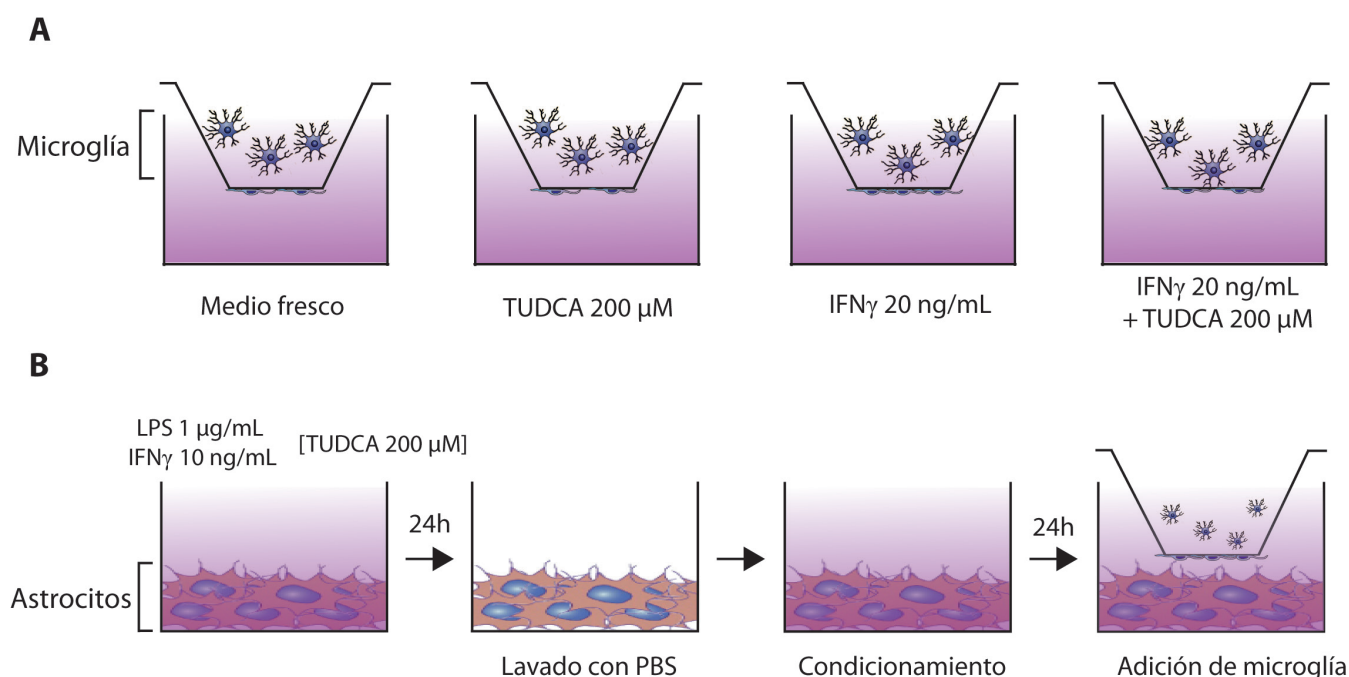


Figura 6. Esquema del procedimiento de transwell de poro de 8 μ m. La capacidad migratoria de la microglía fue determinada sembrando la microglía en la parte superior del inserto de una placa de cultivo transwell, para exponerla a las diferentes condiciones experimentales del medio en el pocillo inferior de la placa. A) La microglía, pretratada con TUDCA 200 μ M o sin pretratamiento, fue expuesta a un medio con estímulo promigratorio (IFN γ 20 μ M). B) La microglía fue expuesta a un medio condicionado por astrocitos pretratados con agentes proinflamatorios (LPS 1 μ g/mL e IFN γ 10 ng/mL) en presencia o ausencia de TUDCA 200 μ M. Los controles fueron: microglía expuesta al medio de cultivo solo (para determinar la capacidad migratoria basal), y con el medio de cultivo con TUDCA 200 μ M, en presencia o ausencia de astrocitos según la condición experimental.

2.2.9. Estudio de la capacidad migratoria de la microglía

El efecto del TUDCA sobre la capacidad de migración propia de la microglía fue determinado sembrando 50.000 células en medio RPMI en la parte superior de un inserto Transwell con un tamaño de poro de 8 μ m, que la microglía puede atravesar (Figura 6). En el pocillo inferior, como agente quimiotáctico, fue añadido IFN γ (20 ng/mL), en presencia o ausencia de TUDCA (200 μ M; Carrigan, Pink et al. 2007, Yin, Tu et al. 2010). Tras 24 h se retiraron con un hisopo las células que no habían migrado

y se fijaron con PFA 4% 15 minutos en hielo las que sí lo habían hecho. Los núcleos celulares fueron teñidos con Hoechst 33258, y la malla de los transwells fue cortada y montada en un portaobjetos, para proceder al recuento celular en un microscopio de fluorescencia.

Para determinar el efecto de los astrocitos reactivos sobre la migración microglial, y su posible inhibición por el tratamiento con TUDCA, los astrocitos fueron sembrados en una placa de 24 pocillos, tratados con TUDCA (200 μ M, 90 minutos) y estimulados posteriormente con LPS (1 μ g/mL) e IFN γ (10 ng/mL) durante 24 h. Tras este tratamiento, el sobrenadante de los astocitos fue retirado y las células lavadas dos veces con PBS. Tras incubar los astrocitos con DMEM con 10% FBS durante 24 h, la microglía fue añadida en el pocillo superior del transwell. Tras 24 h sobre los astrocitos, los transwells fueron procesados como se ha explicado en el párrafo anterior.

Cada experimento se llevó a cabo por triplicado y la cuantificación fue realizada mediante el recuento de las células marcadas, en cinco campos aleatorios de cada transwell, observados con un aumento de 20x.

2.3. Cultivos primarios de neuronas

Los cultivos primarios de neuronas se obtuvieron de las cortezas cerebrales de ratones embrionarios (E17 o E18) de la cepa C57/BL6. Se procedió a la disgregación mecánica de las mismas y a su digestión enzimática con tripsina y ADNasa (20 mg/mL) en HBSS durante 15 minutos en un baño precalentado a 37°C. El tejido homogenizado se centrifugó 10 minutos a 950 rpm, y las células obtenidas se sembraron en medio Neurobasal® suplementado con 2% B27®, 1% GlutaMAX™ y 1% P/S.

2.3.1. Cocultivos de microglía y neuronas

Para los cocultivos de microglía y neuronas, se sembraron en primer lugar 45.000 células de microglía en placas de 24 pocillos. Algunas de las células se pretrataron 2 h con TUDCA 200 μ M y posteriormente se trataron con LPS (200 ng/mL) durante 24 h. Tras esto, se retiró el medio, se lavaron las células con RPMI sin suero, y se sembraron 15.000 neuronas en medio Neurobasal suplementado sobre la microglía tratada. Se mantuvieron en cocultivo durante 72 h y se procesaron para inmunocitoquímica. La densidad neuronal por mm² se determinó mediante el análisis estereológico de 9 campos de 4 pocillos en 3 ensayos independientes siguiendo el método de Gundersen (Gundersen, Bendtsen et al. 1988).

2.3.2. Transwells de microglía y neuronas

Para determinar si las sustancias segregadas por la microglía activada afectan la supervivencia y el desarrollo neuronal, la microglía fue sembrada en la parte superior

de un Transwell, de tamaño de poro 0,4 μm , recubierto con poli-L-Lisina 10 $\mu\text{g/mL}$, de manera que las células no podían atravesar la malla. Tras esto se trataron con TUDCA y/o LPS durante 24 h. Después de los tratamientos, se sembraron 15.000 neuronas en la parte inferior de cada pocillo en medio Neurobasal suplementado con 2% B27®, 1% GlutaMAX™ y 1% P/S, de manera que la microglía quedaba en la parte superior. Las neuronas fueron mantenidas en cocultivo con la microglía durante 72 h, tras lo cual las neuronas fueron fijadas con 4% PFA y procesadas para tinción inmunocitoquímica. La densidad neuronal fue cuantificada mediante el análisis estereológico de 9 campos por triplicado en tres ensayos independientes, siguiendo el método de Gundersen (Gundersen, Bendtsen et al. 1988).

2.4. Técnica de inmunodetección de proteínas por separación electroforética (Western Blot)

Se sembraron las células de microglía ($1,5 \times 10^6$ por pocillo) o los astrocitos ($6 \cdot 10^5$ por pocillo) en placas de 6 pocillos, y se preincubaron 2 h con TUDCA para después añadir el estímulo proinflamatorio correspondiente según el tipo celular (200 ng/mL LPS para microglía o 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS con 10 ng/mL IFN γ para astrocitos).

Para realizar la inmunodetección de proteínas, las muestras tratadas fueron lisadas con un buffer de lisis que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 7,6), NaCl 137 mM, DTT 0,5 mM, Nonidet-P40 1%, dodecil sulfato sódico (SDS) al 0,2%, ácido okadaico 0,5 μM e inhibidores comerciales de proteasas (cOmplete Mini) y fosfatasas (PhosSTOP), después se congelaron a -80°C . Tras sonicar las células (excepto en el caso de las muestras destinadas a la detección del receptor TGR5 que no fueron sonicadas), las proteínas de las muestras se separaron en función de su peso molecular en un gel de poliacrilamida (Sistema electroforético SDS-PolyAcrylamide-Gel-Electrophoresis, SDS-PAGE). La concentración de proteínas fue determinada mediante el método de Bradford, para cargar 50 μg por carril del gel en el caso de las células microgliales, o 25 μg por carril en el caso de los astrocitos, en geles de poliacrilamida al 10% con una fase concentrante y una separadora. La transferencia del gel a la membrana de nitrocelulosa se realizó en una cubeta Hoefer TE22 con un tampón de transferencia (1 g SDS, 100 mL Tampón tris-Glicina 10x, 200 mL metanol y hasta 1 L H $_2$ O milli-Q) a 130 mA/40 V toda la noche a 4°C . La correcta transferencia de las proteínas fue comprobada incubando la membrana con rojo Ponceau, y se procedió a su lavado con H $_2$ O milliQ, seguida de 3 lavados con TBS-T. Se bloqueó la membrana durante 1 h con leche o BSA al 5% en TBS-T y se incubó toda la noche con el anticuerpo primario en agitación a 4°C . Tras lavarla 3 veces con TBS-T y TBS se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) correspondiente durante 1 h 30 minutos y se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBS. La inmunorreactividad se detectó incubando la membrana con el sustrato quimioluminiscente Supersignal

WestPico Chemiluminiscent substrate (Pierce), o Supersignal WestFemto Chemiluminiscent substrate en el caso de las enzimas inducibles de baja expresión. La señal se detectó con películas de alta sensibilidad (GE Healthcare, Reino Unido). Las bandas se densitometraron en un escáner Bio-Rad GS-810 y se cuantificaron con el programa Quantity One 4.2 (BIO-RAD).

2.5. Estudios de expresión génica por PCR cuantitativa (qPCR)

2.5.1. Extracción de ARNm

La extracción de ARN de las células se realizó tras la lisis y congelación de las mismas en TRIzol a -80°C durante al menos 24 h, después de realizar los tratamientos siguiendo el mismo criterio que para la inmunodetección de proteínas. Tras descongelar las muestras, se incubaron con cloroformo 3 minutos a temperatura ambiente y, después de centrifugarlas, se tomó la fase acuosa. La precipitación del ARN fue inducida mediante la adición de isopropanol (proporción 1:1 con la muestra) 10 minutos y tras centrifugarlo de nuevo se lavó el pellet con etanol al 75%. El pellet resultante fue resuspendido en H₂O-DEPC.

2.5.2. Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Para retrotranscribir el ARN, en primer lugar se destruyó el ADN genómico de las muestras mediante la incubación con ADNasa (DNasa I de Fermentas), para después proceder a la síntesis de la primera hebra de cADN y la reacción de retrotranscripción mediante el kit comercial RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific).

2.6. Transfección transitoria con plásmidos reporteros

2.6.1. Transfección de microglía con plásmidos reporteros

La microglía se sembró en placas de 24 pocillos (300.000 células por pocillo) recubiertas con poli-L-lisina (50 µg/mL). Tras 24 h se preparó una mezcla de transfección que contenía un plásmido reportero inducible acoplado a la expresión de la luciferasa de luciérnaga (1 µg) (ver Tabla 7), un plásmido pSV-40-Renilla Luciferasa que expresa constitutivamente la luciferasa del pensamiento de mar (100 ng) como control de eficiencia de transfección, y 1 µL del agente de transfección X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent en medio OPTIMEM por pocillo. Después de 24 h de incubación, la mezcla de transfección se retiró y las células se dejaron en medio con bajo suero toda la noche. Después se trataron con LPS (200 ng/mL) o TUDCA con LPS durante 6 h o 24 h. Tras los tratamientos, las células se lavaron con medio sin suero a 37°C, se añadió 100 µL de tampón de lisis pasiva 1x (PLB, Promega) a cada pocillo y las

placas se almacenaron a -80°C tras sellarlas con Parafilm hasta la determinación de la luminiscencia.

La luminiscencia se midió con un método de detección dual de la actividad luciferasa de luciérnaga (Firefly) y de la luciferasa de pensamiento de mar (Renilla), puesto a punto en nuestro laboratorio (Yanguas-Casás, Barreda-Manso et al. 2014). Las muestras se resuspendieron en un tampón de luciferasa de luciérnaga (50 o 100 μL /muestra, que contenía Tricina 30 mM, EDTA 0,1 mM pH 8, MgSO_4 15 mM, DTT 10 mM, ATP 533,3 μM , D-Luciferina 0,4 mM y Coenzima A 0,27 mM ajustado a pH 7,8) y se midió la actividad de emisión luminiscencia (por la reacción luciferina-luciferasa) en un luminómetro Sirius. Tras esto se añadió al mismo tubo el tampón de la luciferasa de pensamiento de mar (100 o 200 μL /muestra, que contenía NaCl 1,1 M, $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 2,2 mM, KH_2PO_4 0,22 M pH 5,1, BSA 0,44 mg/mL, NaN_3 1,3 mM y Coelenterazina 1,43 μM ajustado a un pH 5) y se midió la actividad renilla-luciferasa. Los resultados se expresaron como el cociente entre la actividad luciferasa de luciérnaga respecto de la actividad luciferasa de pensamiento de mar de cada muestra.

2.6.2. Transfección de astrocitos con plásmidos reporteros

Los astrocitos se sembraron en placas de 96 pocillos (20.000 células por pocillo) recubiertas con poli-L-lisina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Tras 24 h se preparó una mezcla de transfección que contenía un plásmido reportero inducible acoplado a la expresión de la luciferasa de luciérnaga (0,2 μg) (ver Tabla 7), un plásmido pSV-40-Renilla Luciferasa que expresa constitutivamente la luciferasa del pensamiento de mar (50 ng) como control de eficiencia de transfección, y 0,4 μL del agente de transfección X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent en medio OPTIMEM por pocillo. Después de 24 h de incubación, la mezcla de transfección se retiró y las células se dejaron en medio con bajo suero toda la noche. Después se trataron en presencia o ausencia de TUDCA 200 μM con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e $\text{IFN}\gamma$ (10 ng/mL), durante 6 h o 24 h. Tras los tratamientos, las células se lavaron con medio sin suero a 37°C , se añadió 100 μL de tampón de lisis pasiva 1x (PLB, Promega) a cada pocillo y las placas se almacenaron a -80°C tras sellarlas con Parafilm hasta la determinación de la luminiscencia.

La luminiscencia se midió con el método de detección dual de la actividad luciferasa descrito en el apartado anterior.

2.6.3. Silenciamiento del receptor GPBAR1/TGR5 en células microgliales

Se sembraron 300.000 células de microglía por pocillo en placas de 24 pocillos recubiertas con poli-L-lisina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Utilizamos dos siARNs comerciales prediseñados contra el receptor Gpbar1/TGR5 de rata (s165474 y s165475) y un control negativo (Silencer® Select Negative Control N° 1), todos ellos de Ambion®.

Después de 24 h las células fueron transfectadas en OPTIMEM con una mezcla de uno de los siARNs (2 nM), plásmido reportero de luciferasa de luciérnaga (1 µg), plásmido reportero de renilla (100 ng) y el compuesto de transfección Lipofectamina® 2000 (1 µL), por pocillo. Tras 48 h de incubación, el medio se retiró de los pocillos y las células se dejaron toda la noche en medio sin suero. Posteriormente las células se trataron siguiendo el mismo protocolo que en los experimentos de transfección transitoria (apartado 2.6.1).

2.6.4. Estudio de la expresión génica en la microglía tras silenciar el receptor GPBAR1/TGR5

Las células de microglía se sembraron a razón de $1,5 \times 10^6$ células por pocillo en placas de 6 pocillos, y se transfectaron 24 h tras la siembra, con una mezcla de uno de los siARNs de GPBAR1/TGR5 y Lipofectamina® 2000 durante 48 h en medio OPTIMEM. Tras esto, las células se dejaron sin suero durante la noche y se trataron con LPS o LPS y TUDCA durante 6 o 24 h. Posteriormente las células se procesaron para la extracción del ARNm como se indica en el apartado 2.5, y se estudió la expresión génica de las mismas mediante PCR cuantitativa.

2.7. **Obtención de linfocitos y monocitos**

2.7.1. Extracción de linfocitos y monocitos de nódulos linfáticos cervicales y cerebro en animales tratados durante 1 día

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical, y se extrajeron los ganglios linfáticos cervicales y el cerebro. Posteriormente, los tejidos se homogeneizaron en 5 mL de RPMI. Las células mononucleares de los cerebros se aislaron en un gradiente de Percoll TM®.

2.7.2. Inmunocitoquímica para la caracterización de poblaciones celulares por citometría de flujo (FACS)

La caracterización de las poblaciones celulares se realizó mediante inmunocitoquímica de diferentes marcadores conjugados a fluoróforos (ver tabla 2). En el caso del factor de transcripción Foxp3, su expresión se estudió tras inhibir la secreción proteica mediante la adición de Brefeldina (1x) y Monesina (1x) a cada submuestra durante 3h, a 37°C.

Para ello, las células (10^6) se incubaron con el marcador de viabilidad celular Fixable Viability Dye eFluor® 780 30 minutos a 4°C. Tras lavar el exceso de marcador, las fracciones constantes (Fc) se bloquearon con el anticuerpo CD16/CD32 de BDPharmingen 15 minutos a 4°C, y a la incubación con los anticuerpos marcadores

de superficie 30 minutos a 4°C. Posteriormente las células se fijaron y fueron permeabilizadas con el Foxp3 Fixation & Permeabilization Buffer Kit (R&D Systems®) y se añadieron los anticuerpos intracelulares durante 30 minutos a 4°C. Por último, las células se lavaron 3 veces con PBS y se almacenaron a 4°C en oscuridad hasta su análisis en el citómetro. Descartamos del análisis las células muertas, y adquirimos un mínimo de 10.000 células en cada mezcla de tinción para cada tratamiento. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa FACSDiva.

2.8. Microscopía óptica y confocal

Las imágenes de microscopía óptica se obtuvieron en un microscopio Olympus Provis AX70 acoplado a un sistema de captura de imagen Olympus DP70, analizando al menos 6 secciones de cada individuo por cada marcaje.

Las imágenes de microscopía confocal se realizaron en un sistema confocal Leica TCS-SP5 acoplado a un microscopio Leica DMI6000CS.

Las cuantificaciones histológicas e inmunocitoquímicas fueron realizadas en condiciones de doble ciego, utilizando para su análisis el programa Image J (Wayne Rasband, NIH, EE.UU.).

2.9. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó con el programa GraphPad Prism versión 5.0 para Windows. La homogeneidad de las varianzas se determinó con el test ANOVA de una vía (en aquellos casos con el mismo número de observaciones entre grupos) o la prueba de Kruskal-Wallis (para los ensayos que no seguían una distribución Gausiana), y se realizó un post-test de Tuckey para determinar diferencias en las varianzas entre los pares de tratamientos.

En función de la distribución muestral se realizaron diferentes tests para la comparación entre dos grupos, la prueba paramétrica t de Student (cuando existía homocedasticidad y el mismo número de observaciones en ambos grupos), la t de Student no paramétrica (cuando la distribución muestral no se ajustaba a una Gausiana) o la prueba de la U de Mann-Whitney o la t de Student no paramétrica con la corrección de Welch (en los casos de heterocedasticidad). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$, $p < 0,01$ o $p < 0,001$.



RESULTADOS

1. Efecto del TUDCA sobre la neuroinflamación

La activación de células inmunitarias residentes en el SNC tiene un papel fundamental en el desarrollo de la neuroinflamación. La microglía se encuentra en un continuo estado de vigilancia, y ante cualquier agresión externa o daño tisular se moviliza hacia la zona afectada, adquiriendo un fenotipo reactivo (característicamente ameboide) y haciendo frente a la agresión para garantizar la homeostasis tisular (Hanisch y Kettenmann 2007). La respuesta neuroinflamatoria aguda también implica la activación de los astrocitos (Dong Y 2001). Estos adquieren un fenotipo reactivo y liberan un gran cantidad de mediadores inflamatorios, que incluyen citoquinas pro y antiinflamatorias, y quimioquinas que incrementan la permeabilidad de la BHE, facilitando así el paso de otros tipos celulares al parénquima afectado (Bauer J 2001, Schroeter M 2005). Por ello, decidimos estudiar el efecto del TUDCA en la activación proinflamatoria de estos dos tipos celulares.

1.1. Efecto del TUDCA en la activación de la ruta proinflamatoria.

Como primera aproximación, medimos la producción de nitritos inducida por un estímulo proinflamatorio en cultivos de microglía y astrocitos, para determinar si el TUDCA inhibía la inducción de la cascada inflamatoria. Los resultados muestran que el tratamiento con TUDCA reducía significativamente la producción de nitritos en ambos tipos celulares (Figura 7 A-B).

Para determinar a qué nivel se producía el efecto sobre la disminución de nitritos transfectamos ambos tipos gliales con un plásmido reportero que contenía el promotor de la iNOS de rata y también se extrajo ARNm de las células tras su tratamiento con LPS o LPS y TUDCA. Los resultados demostraron que el pretratamiento de las células con TUDCA durante 2 h reducía la actividad del promotor de la iNOS de rata, inducida por un estímulo proinflamatorio (Figura 7 C-D), así como el incremento en la transcripción de su ARNm (Figura 7 E-F). Por lo tanto, el efecto inhibitorio del TUDCA en la producción de nitritos inducida por un estímulo proinflamatorio depende principalmente de la regulación transcripcional de la iNOS.

La activación de la ruta del NFκB en las distintas condiciones experimentales se estudió en primer lugar mediante la transfección de las células con un plásmido reportero de NFκB (Chow y cols. 1999). El tratamiento con un estímulo proinflamatorio indujo la activación del reportero, tanto en astrocitos como en microglía y el pretratamiento con TUDCA redujo significativamente la magnitud de esta activación en ambos tipos celulares hasta niveles control ($p < 0,05$; Figura 8 A-B).

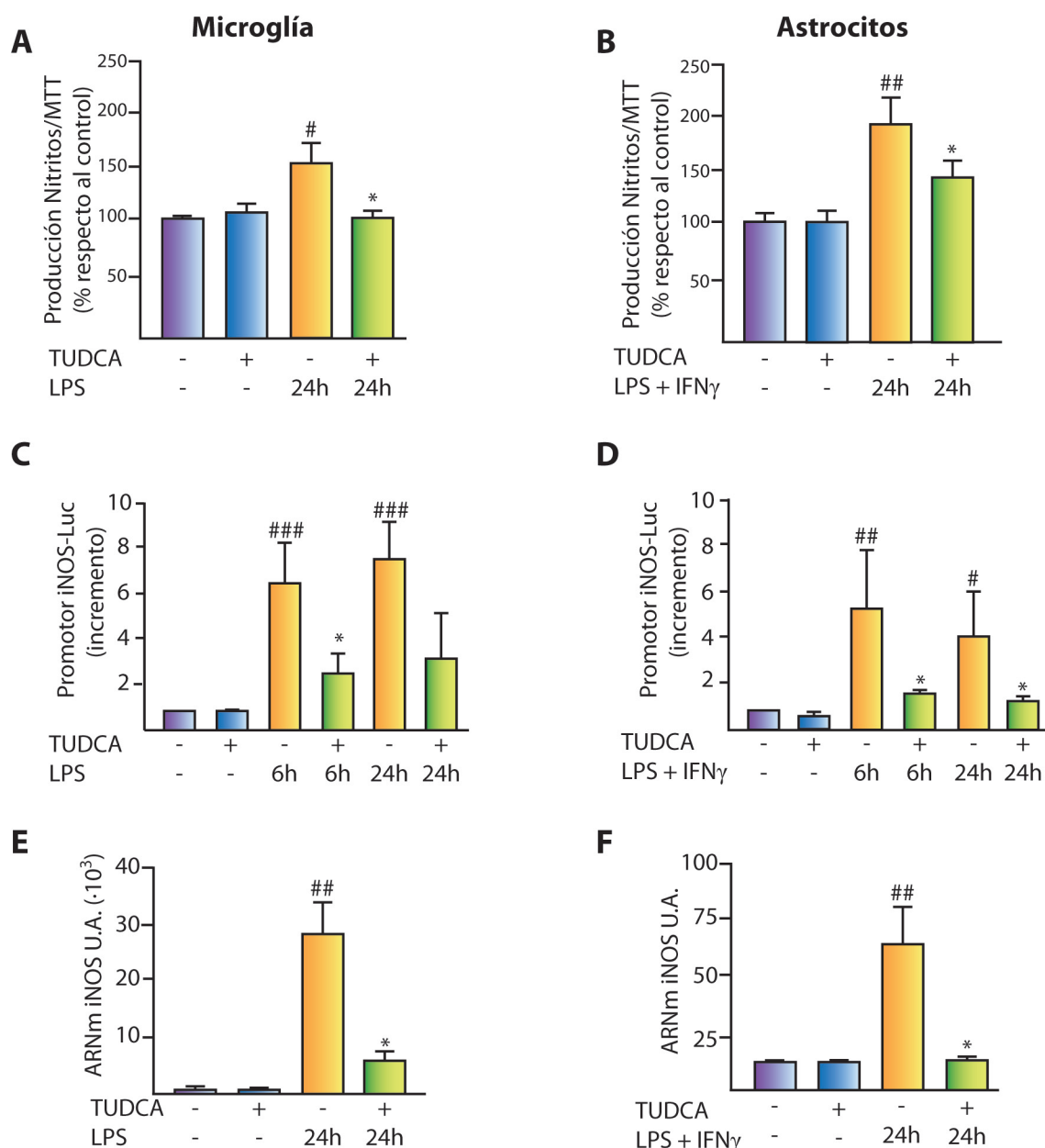


Figura 7. El tratamiento con TUDCA reduce la producción de nitritos inducida por estímulos proinflamatorios en cultivos de células gliales mediante la inhibición transcripcional de la iNOS. El efecto del TUDCA en la vía de la iNOS se determinó en microglía (A, C, E) y astrocitos (B, D, F). Para ello se pretrataron las células con TUDCA durante 2 h y se añadió un estímulo proinflamatorio durante 24 h. (A, B). Las gráficas muestran la producción de nitritos en al menos 6 experimentos en microglía y 4 en astrocitos por triplicado. (C, D) Activación del reportero de rata iNOS-pGL3 tomando como reportero control de eficiencia de transfección el plásmido SV40-pRL Renilla. Las gráficas muestran el incremento respecto del control en al menos 4 experimentos por triplicado. (E, F) Expresión de ARNm de la iNOS mediante PCR cuantitativa. Las gráficas muestran el ratio entre el ARNm de la iNOS/ARNm de un gen control (36B4 para microglía y β -actina para astrocitos). Los resultados representan la media \pm EEM. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ respecto del control. * $p < 0,05$ respecto del tratamiento con LPS.

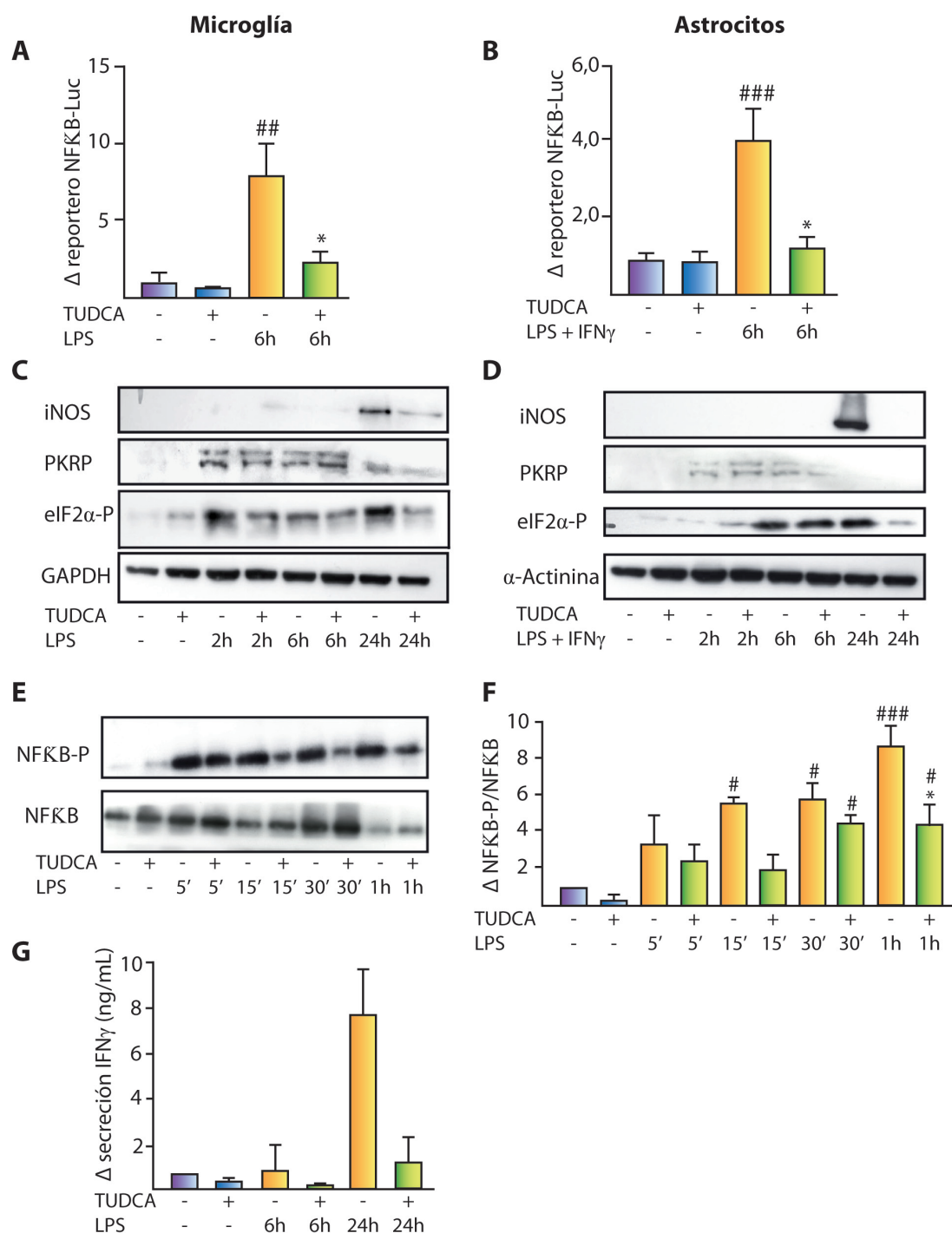


Figura 8. El TUDCA inhibe la activación de NF κ B inducida por estímulos proinflamatorios en las células gliales. El efecto del TUDCA en la activación de la vía de NF κ B se determinó en microglía (A) y astrocitos (B), mediante el estudio de la activación del reportero de NF κ B-pGL3 inducida por estímulos proinflamatorios. Los resultados se representan como el incremento de activación respecto del control de al menos cuatro experimentos por triplicado. La expresión de iNOS y el estado de fosforilación de PKR (PKRP) y de eIF2 α (eIF2 α -P) se determinaron por western blot en microglía (C) y astrocitos (D), tomando como control de carga el GAPDH y la α -actinina respectivamente. La activación de NF κ B en microglía se estimó mediante el grado de fosforilación de la subunidad p65 (NF κ B-P) respecto del total (E), y se cuantificó (F) en 4 experimentos independientes. (G) La secreción de IFN γ (pg/10⁶ células) se midió en medios condicionados de microglía tratada en 4 experimentos por triplicado. Las gráficas representan la media \pm EEM. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ con respecto al control. * $p < 0,05$ con respecto al tratamiento con LPS.

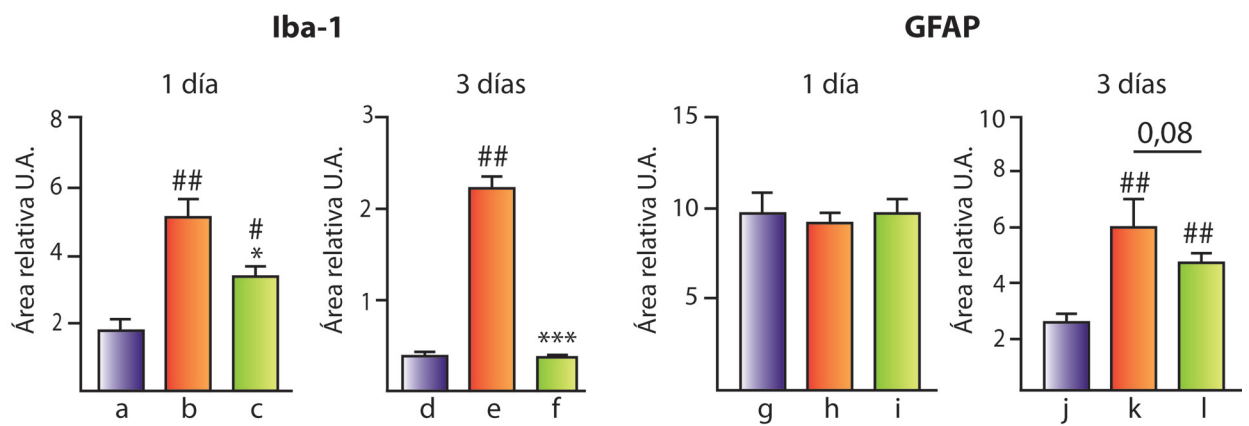
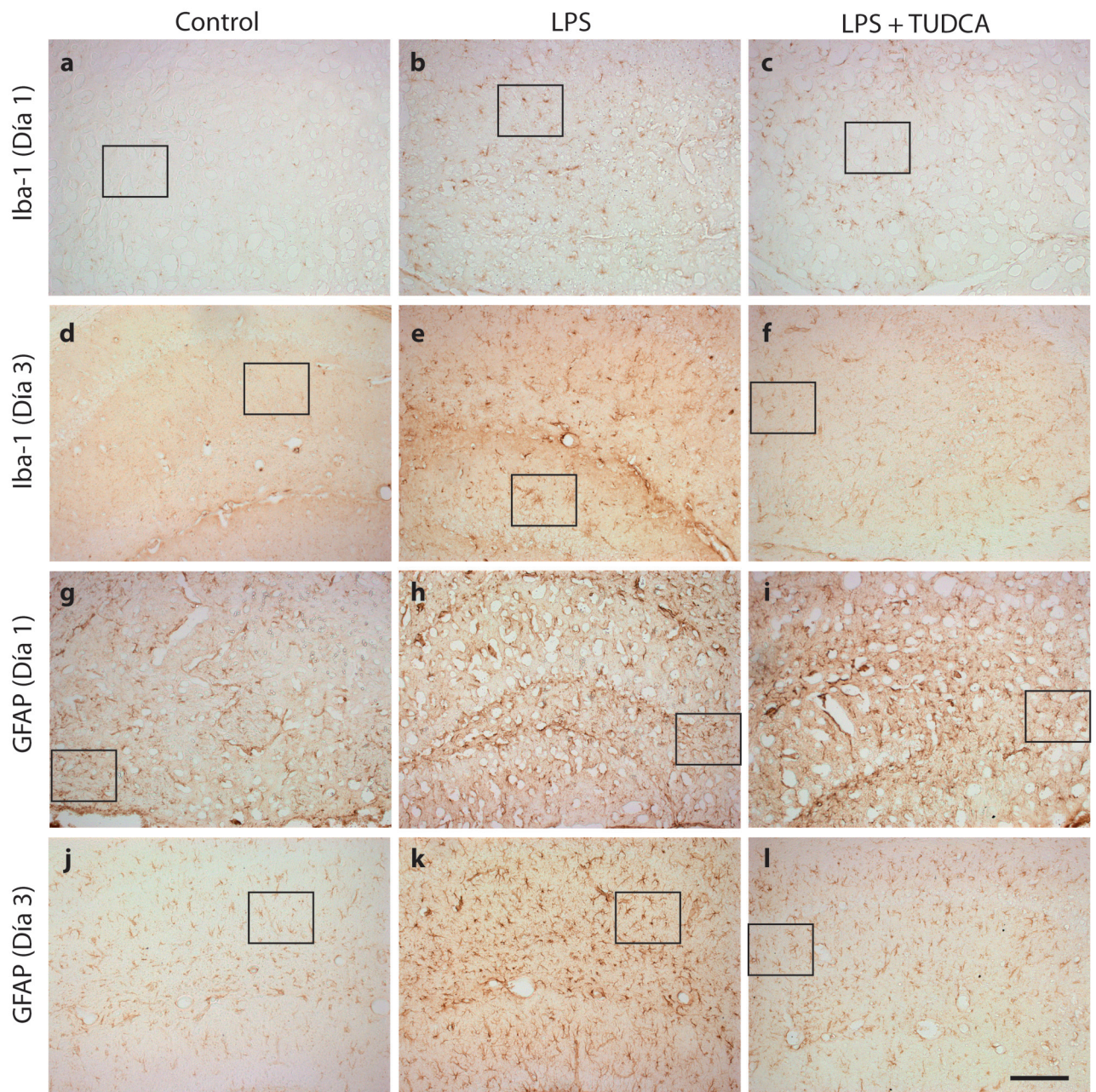
En respuesta a situaciones de estrés celular, como es un ambiente inflamatorio, diferentes quinasas, entre las que se encuentra la PKR, fosforilan la subunidad alfa del factor de iniciación eucariótico 2 (eIF2 α). Esta fosforilación limita la síntesis proteica a partir de ARNm en el retículo endoplásmico rugoso, controlando la síntesis de proteínas no necesarias para la supervivencia celular. Una vez finalizada la situación de estrés celular, la serin/treonin fosfatasa PP1 desfosforila eIF2 α , y se restaura la síntesis proteica normal (Proud 2007).

El estudio de diferentes proteínas implicadas en la cascada proinflamatoria dio como resultado que la expresión de la proteína iNOS, así como la fosforilación en la serina 51 de eIF2 α , disminuían en la microglía y astrocitos pretratados con TUDCA. Sin embargo, no se observó ningún efecto, en ninguno de los tipos celulares, en el incremento de la fosforilación de la serina 451 en la protein quinasa activada por ARN (PKR) tras el estímulo proinflamatorio correspondiente en ninguno de los tipos celulares (Figura 8 C-D).

El grado de activación de NF κ B, se estudió evaluando la relación entre la fosforilación en la serina 536 en p65 de NF κ B inducida por LPS a diferentes tiempos y el NF κ B total en microglía. Los resultados mostraron que el tratamiento con TUDCA inhibía la fosforilación inducida por el tratamiento con LPS, siendo la inhibición estadísticamente significativa en el tratamiento 1 h tras la adición de la endotoxina ($p < 0,05$; Figura 8 E-F).

Por último, medimos la secreción por la microglía de una citoquina proinflamatoria regulada por NF κ B, el IFN γ . El tratamiento con LPS indujo la secreción de IFN γ , siendo el incremento más pronunciado a las 24 h, y el pretratamiento con TUDCA mantuvo esta secreción en niveles basales aún en presencia del estímulo proinflamatorio (Figura 8 G).

Figura 9. El TUDCA reduce la activación de la microglía en el hipocampo de ratones tratados con LPS. Las microfotografías muestran la inmunorreactividad para Iba-1 (marcador de microglía) (a-f) y GFAP (marcador de astrocitos) (g-l) de secciones de hipocampo representativas para los tratamientos de: control de 1 día (a, g), icv LPS 1 día (b, h), icv LPS + TUDCA ip (c, i), control de 3 días (d, j), icv LPS 3 días (e, k), icv LPS + TUDCA ip 3 días (f, l). El efecto del TUDCA en la activación glial se determinó cuantificando la inmunorreactividad del área estudiada con respecto del área total para cada anticuerpo en al menos 5 secciones de 6 animales por grupo. Los resultados representan la media \pm EEM de las cuantificaciones. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ respecto de los controles. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ respecto del tratamiento con LPS. Barra de calibración: 100 μ m.



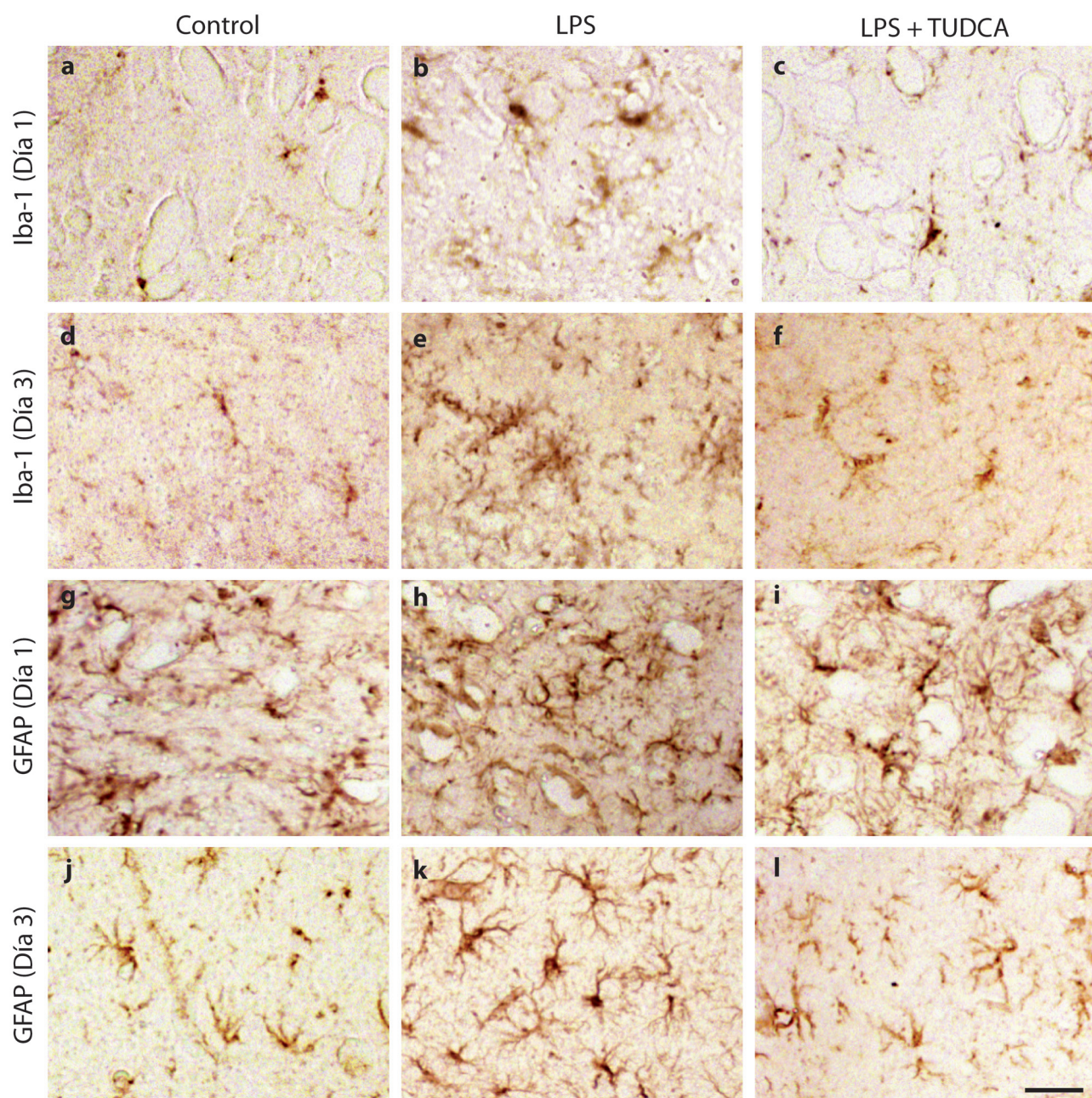


Figura 9b. Ampliación de las regiones seleccionadas. Las microfotografías muestran la inmunorreactividad para Iba-1 (marcador de microglía) (a-f) y GFAP (marcador de astrocitos) (g-l) de secciones de hipocampo representativas de los tratamientos de: control de 1 día (a, g), icv LPS 1 día (b, h), icv LPS + TUDCA ip (c, i), control de 3 días (d, j), icv LPS 3 días (e, k), icv LPS + TUDCA ip 3 días (f, l). Barra de calibración 20 μ m.

1.2. Efecto del TUDCA sobre la gliosis en ratones inyectados con LPS

Dado que el TUDCA inhibía la ruta proinflamatoria *in vitro*, procedimos al estudio del efecto de la sal biliar en la reactividad glial en el hipocampo de ratones en un modelo murino de neuroinflamación aguda.

La reactividad glial se estudió en secciones coronales de los hipocampos de ratones inyectados icv con LPS, 1 y 3 días tras la inyección y tratados o no con TUDCA. La reactividad glial fue determinada mediante la inmunorreactividad frente a GFAP para astrocitos e Iba-1 para la microglía.

La inmunorreactividad frente a Iba-1 aumentó tanto a 1 como 3 días tras la inyección de LPS en comparación con los ratones control, que habían sido inyectados con PBS en las mismas coordenadas estereotáxicas (Figura 9 a-b y d-e). En cambio, la respuesta de inmunorreactividad frente a GFAP, no aumentó hasta el tercer día (Figura 9 g-h y j-k).

La inyección ip de TUDCA redujo significativamente la reactividad microglial en ambos tiempos, siendo más pronunciada la reducción en el día 3 (Figura 9 c, f). Sin embargo, el incremento de la reactividad astrocitaria a los 3 días no se redujo tras el tratamiento con la sal biliar, lo que sugiere que el TUDCA tenía un efecto específico sobre las células microgliales (Figura 9 i, l).

Con el fin de determinar si la reducción en la inmunorreactividad de Iba-1 en los hipocampos de los ratones tratados con TUDCA, en comparación con los inyectados sólo con LPS, era debida no sólo a una reducción en la reactividad microglial sino a la cantidad de células de microglía totales, realizamos un recuento del número de células Iba-1+ por mm² en todos los grupos experimentales.

El análisis mostró una reducción significativa en el número de células microgliales en los ratones tratados con TUDCA tras la inyección de LPS, en comparación con los ratones inyectados con LPS (Figura 10).

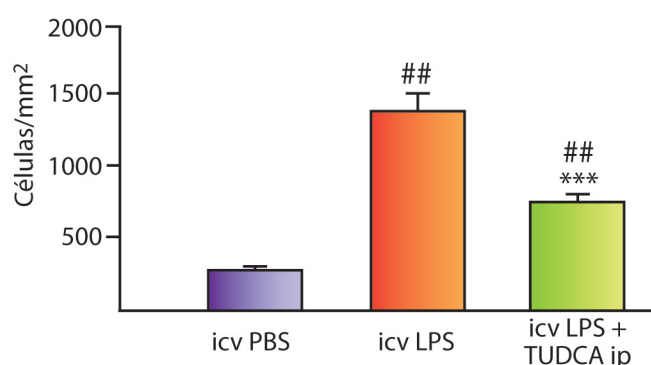


Figura 10. El TUDCA reduce la microglía activada en el hipocampo de los ratones tratados con LPS. Se contaron las células Iba-1+/mm² en al menos cinco secciones de hipocampo de al menos 6 animales por grupo experimental. Los resultados muestran la media \pm EEM. ## $p < 0,01$ respecto del control; *** $p < 0,001$ respecto del tratamiento con LPS.

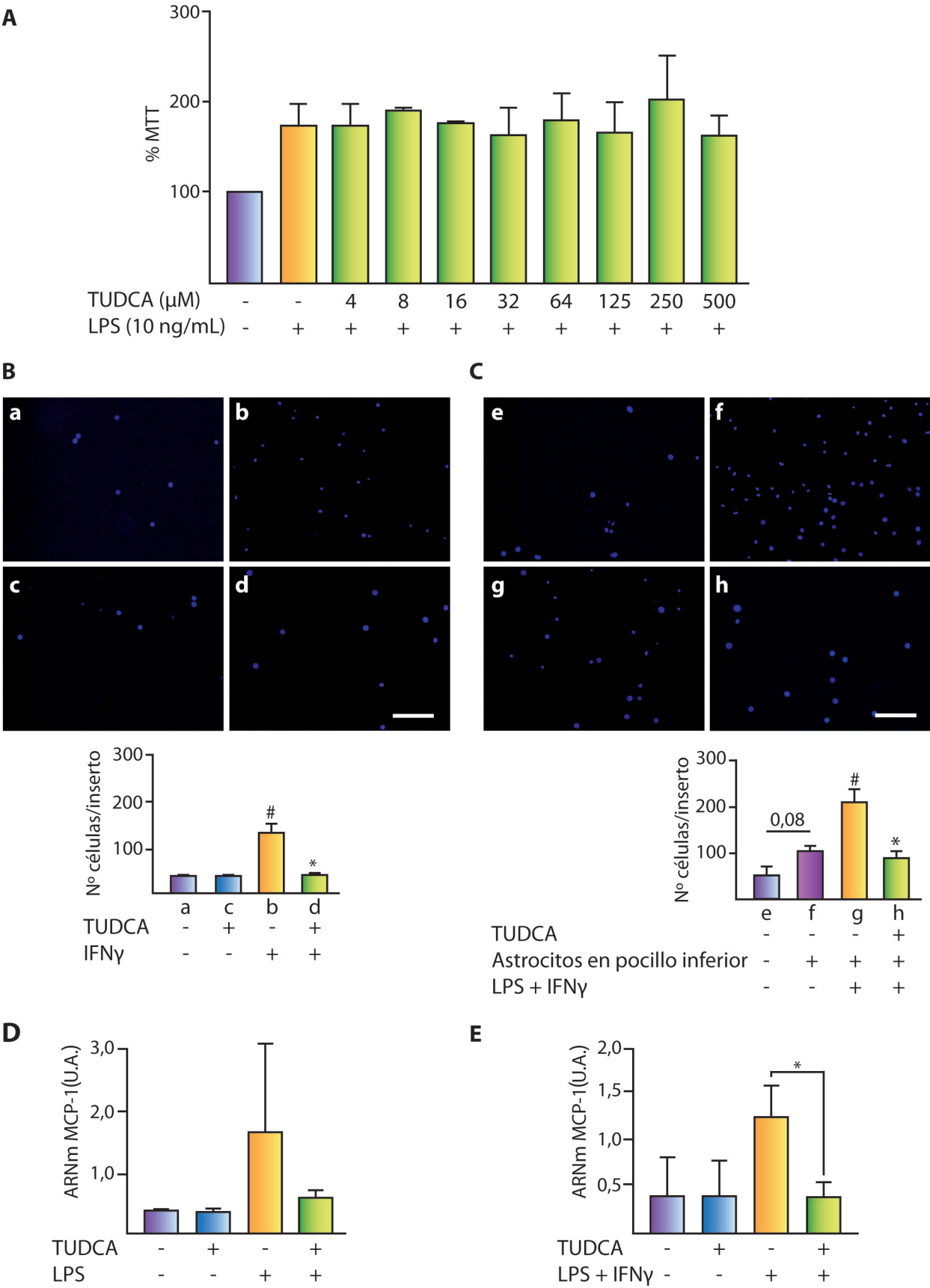


Figura 11. El TUDCA no afecta a la proliferación de la microglía, pero sí reduce su migración *in vitro*.

(A) El efecto del TUDCA en la capacidad proliferativa de la microglía inducida por un estímulo mitogénico (LPS 10 ng/mL) se estudió midiendo el incremento en el metabolismo por MTT. La migración se determinó empleando (B) IFN γ (20 ng/mL) y (C) medio condicionado durante 24 h por astrocitos pre-estimulados como agente quimiotáctico. Se contó el número de células DAPI positivas que habían traspasado el inserto en cada grupo experimental. Las microfotografías representan las células tratadas con (a) Medio control, (c) Control con TUDCA 200 μ M, (b) IFN γ (20 ng/mL), (d) IFN γ (20 ng/mL) + TUDCA 200 μ M, (e) Medio control, (g) Medio condicionado por astrocitos sin tratar, (f) Medio condicionado por astrocitos tratados con LPS (1 μ g/mL) e IFN γ (10 ng/mL) y (h) Medio condicionado por astrocitos pretratados con TUDCA 200 μ M y tratados con LPS (1 μ g/mL) e IFN γ (10 ng/mL). La expresión de ARNm de MCP-1 se determinó mediante qPCR en microglía (D) y astrocitos (E). Los resultados representan la media \pm EEM del ratio de la expresión de MCP-1 respecto del control endógeno (36B4 para microglía y β -actina para astrocitos) de al menos 3 experimentos por triplicado. # $p < 0,05$ respecto del control; * $p < 0,05$ respecto del tratamiento con LPS. Barra de calibración: 50 μ m.

El efecto del TUDCA podría deberse tanto a una inhibición en la proliferación de la microglía como a una disminución de la migración al parénquima afectado de microglía residente o de monocitos del torrente sanguíneo. Para determinar si el TUDCA afectaba a la proliferación o la migración microglial, se realizó una aproximación *in vitro*.

La capacidad proliferativa de la microglía, inducida por LPS (10 ng/mL), fue determinada indirectamente, utilizando un ensayo de viabilidad celular con MTT, ya que el incremento en el número de células tiene como resultado un incremento en la medida de MTT. No se apreciaron diferencias en cuanto a la proliferación microglial inducida por LPS al tratarla con diferentes concentraciones de TUDCA (4 – 500 μ M) (Figura 11 A).

El estudio del efecto del TUDCA en la migración de la microglía, se estudió empleando unas placas Transwell, en cuyo pocillo inferior se añadió IFN γ (20 ng/mL) como agente quimiotáctico, para crear un gradiente. La adición de IFN γ generó un incremento de 4 a 6 veces en la migración microglial, un efecto que desapareció al pretratar la microglía con TUDCA (Figura 11 B).

Valoramos, además, el posible efecto del TUDCA en la secreción de quimioquinas por los astrocitos. En situaciones control, los astrocitos sin estimular indujeron un incremento de la migración microglial de 3 veces, respecto del control sin astrocitos. La activación con LPS e IFN γ indujo la liberación de agentes quimiotácticos al medio que supuso un incremento de 2 veces en la migración microglial, comparado con los astrocitos no tratados. El pretratamiento con TUDCA revirtió la migración microglial, lo que sugiere que el TUDCA reducía la expresión de factores quimiotácticos inducidos por la vía proinflamatoria en los astrocitos (Figura 11 C).

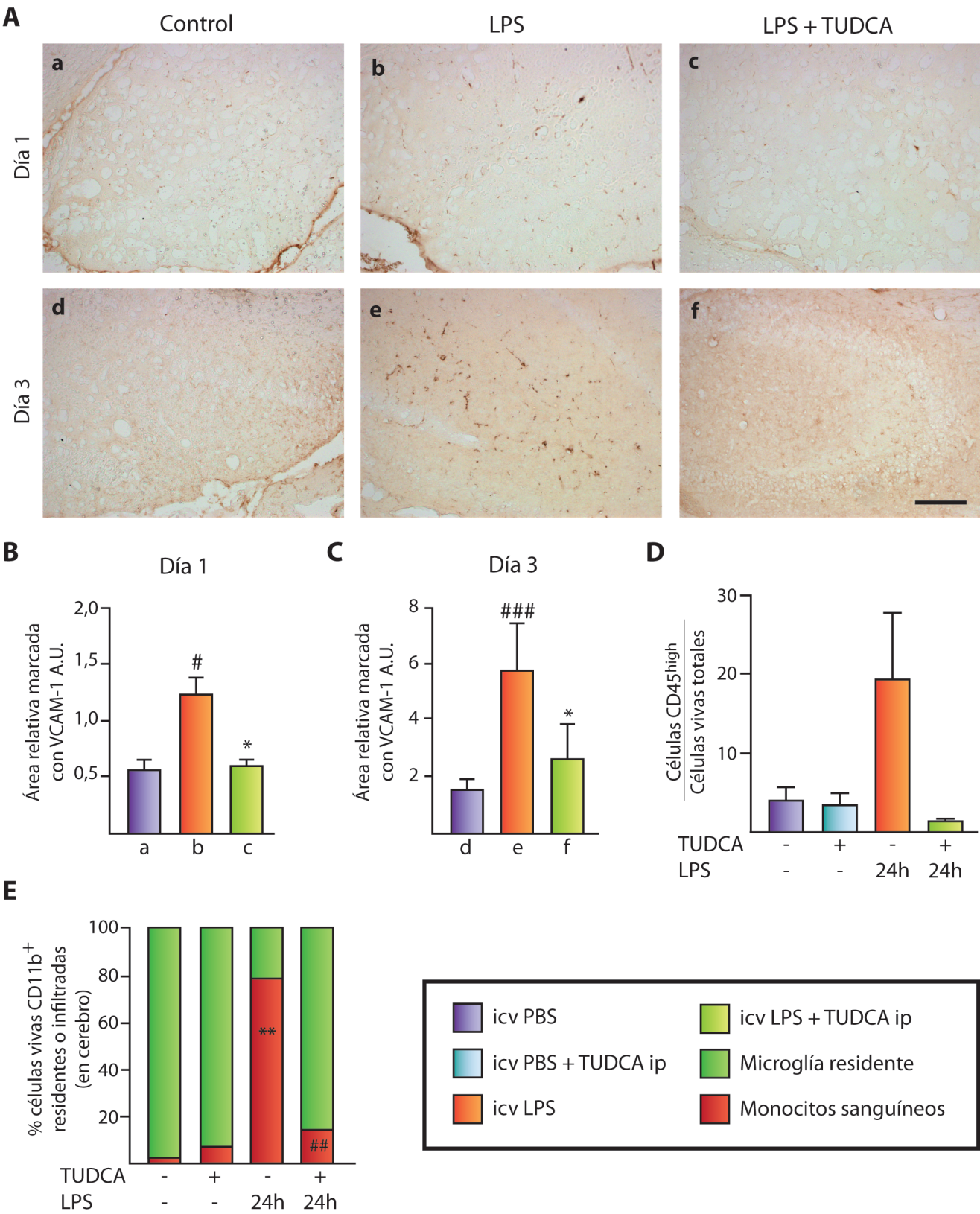


Figura 12. El tratamiento con TUDCA reduce la expresión de VCAM-1 y limita la infiltración de monocitos sanguíneos en el hipocampo de ratones tratados con LPS.

(A) El efecto del TUDCA en la activación del endotelio vascular se determinó estimando el área relativa inmunorreactiva para VCAM-1 en el hipocampo de ratones 1 día (a-c) y 3 días (d-f) tras la inyección de LPS. Microfotografías representativas de secciones (a) Control de 1 día, (b) 1 día tras icv LPS, (c) 1 día tras icv LPS, pretratado con TUDCA ip, (d) Control de 3 días, (e) 3 días tras la inyección icv de LPS, (f) 3 días tras la inyección icv de LPS, pretratado con TUDCA ip. Los resultados representan la media \pm EEM de al menos cinco secciones de 6 animales por grupo a día 1 (B) y día 3 (C). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. Barra de calibración 100 μ m. (D) El infiltrado de células sanguíneas en el parénquima cerebral se determinó por citometría, identificando el total de células con alta expresión del marcador CD45 (o CD45^{high}) con respecto a las células vivas. (E) El infiltrado de monocitos y las células de microglía se clasificaron por citometría identificando el total de células CD11b positivas en las muestras de cerebro y clasificándolas en monocitos (CD11b⁺CD45^{high}) o microglía residente (CD11b⁺CD45^{low}). La gráfica muestra la proporción de monocitos sanguíneos (■) y microglía (■) con respecto al total de células CD11b⁺ purificadas del cerebro de los ratones tratados. ## $p < 0,01$ respecto del control, ** $p < 0,01$ respecto del tratamiento con icv LPS.

Estudiamos la regulación transcripcional de la Proteína Quimiotáctica de Monocitos-1 (MCP-1), una de las quimioquinas más relevantes para la atracción de microglía y monocitos a la zona afectada, para comprobar si el TUDCA afectaba directamente la producción de factores favorecedores de la migración, mediante qPCR tanto en astrocitos como en microglía. Los resultados mostraron que, cuando los ratones eran tratados con TUDCA ip, el incremento en el ARNm de MCP-1 inducido por el estímulo proinflamatorio se revertía significativamente en astrocitos, y se observaba la misma tendencia en la microglía, (Figura 11 D-E).

Posteriormente, estudiamos en nuestro modelo de neuroinflamación *in vivo* si, además de la producción de citoquinas promigratorias, también estaba afectada la expresión de la proteína Vascular de Adhesión Celular 1 (VCAM-1), una de las proteínas clave en la trans migración celular a través de la BHE (Weiss, Miller et al. 2009). El incremento de VCAM-1 era patente 1 día tras la inyección icv de LPS ($p < 0,05$), y alcanzaba una reactividad mayor a los 3 días ($p < 0,001$; 5 veces en comparación con los animales control). En ambos tiempos, el incremento de su expresión se reducía significativamente cuando los ratones habían sido tratados con TUDCA ($p < 0,05$; Figura 12 A-C).

Por último, estudiamos el infiltrado de células sanguíneas y monocitos en el cerebro de ratones 1 día tras la inyección icv de LPS. Para ello, extrajimos los cerebros de estos ratones y purificamos las células mononucleares con un gradiente de Percoll®, para su posterior análisis por citometría de flujo. Tanto el infiltrado de células sanguíneas como el de monocitos en el parénquima cerebral producido 24 h tras la inyección de LPS, se vieron reducidos tras la inyección de TUDCA (Figura 12 D-E).

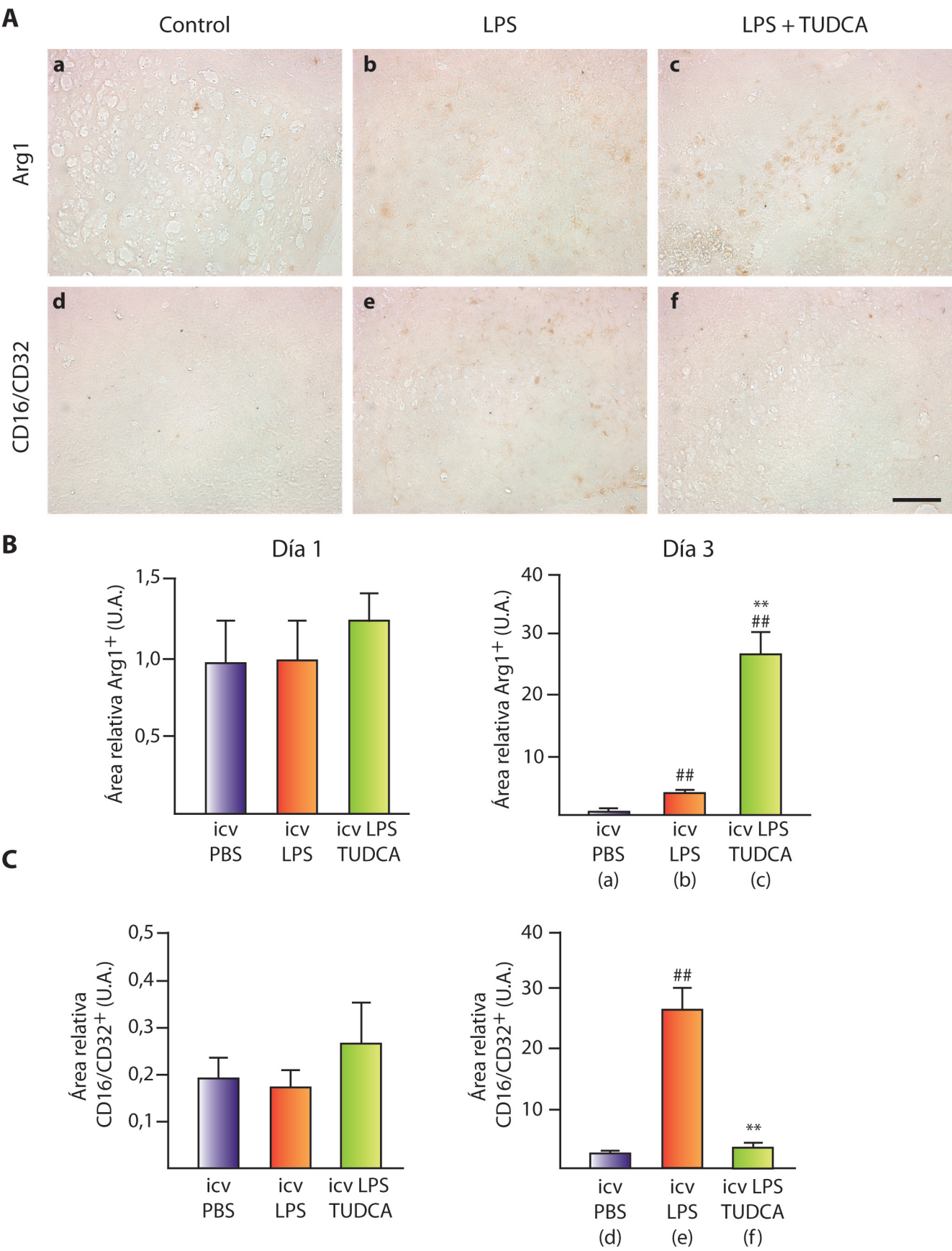


Figura 13. En el hipocampo de ratones tratados con LPS icv, el TUDCA aumenta la expresión de Arg1 y reduce la de CD16/CD32. A) La inmunorreactividad para Arginasa 1 (a-c) y CD16/CD32 (d-f) se determinó en los hipocampos de ratones 1 y 3 días tras la inyección icv de LPS. Las secciones se corresponden con los tratamientos (a, d) Control, (b, e) LPS y (c, f) LPS con inyección de TUDCA ip. Los resultados de la cuantificación de la inmunoreactividad para Arg1 (B) y CD16/CD32 (C) a los días 1 y 3 representan la media \pm EEM de al menos 5 secciones de 6 animales por grupo. ## $p < 0,01$, ** $p < 0,01$. Barra de calibración: 100 μ m.

2. Efecto del TUDCA en el fenotipo microglial

Como hemos descrito en la Introducción, es posible caracterizar el fenotipo microglial en pro o antiinflamatorio mediante el análisis de diferentes marcadores (ver Tabla 1). Dado que el TUDCA tenía un efecto directo en las células de microglía y reducía su reactividad y número *in vivo*, decidimos estudiar si producía algún efecto en el fenotipo microglial, tanto *in vivo* como *in vitro*.

2.1. En el hipocampo de los ratones inyectados icv con LPS, el TUDCA aumenta la microglía tipo M2 y reduce las células M1

Estudiamos la expresión de Arginasa 1 (Arg1), como marcador de microglía antiinflamatoria (fenotipo M2), y de CD16/CD32 como marcador de microglía pro-inflamatoria (fenotipo M1; Kigerl y cols. 2009, David y Kroner 2011) en el modelo de neuroinflamación por inyección icv de LPS, tanto a 1 como a 3 días.

No observamos ninguna diferencia en la expresión de los marcadores (Arg1 o CD16/CD32) entre los controles y los animales tratados con LPS o LPS y TUDCA hasta 3 días después de la inyección icv de LPS. En este tiempo, el tratamiento con TUDCA indujo un incremento en la inmunorreactividad para la Arg1 en el hipocampo, en comparación con los ratones a los que sólo se había inyectado LPS (Figura 13 B). Por el contrario, la inmunorreactividad para CD16/CD32 era muy superior en los animales inyectados sólo con LPS, que en aquellos que además fueron tratados con TUDCA (Figura 13 C).

El número de las células de microglía con fenotipo M1 (CD16/CD32 positivas, CD16/CD32⁺) y fenotipo M2 (Arg1 positivas, Arg1⁺) en los animales inyectados icv con LPS y en aquellos que además se habían tratado con TUDCA, fue determinado por colocalización de estos marcadores con Iba-1. El TUDCA produjo un incremento de las células Iba-1⁺/Arg1⁺ y una reducción de las Iba-1⁺/CD16/CD32⁺ en comparación con los animales inyectados sólo con LPS (Figura 14).

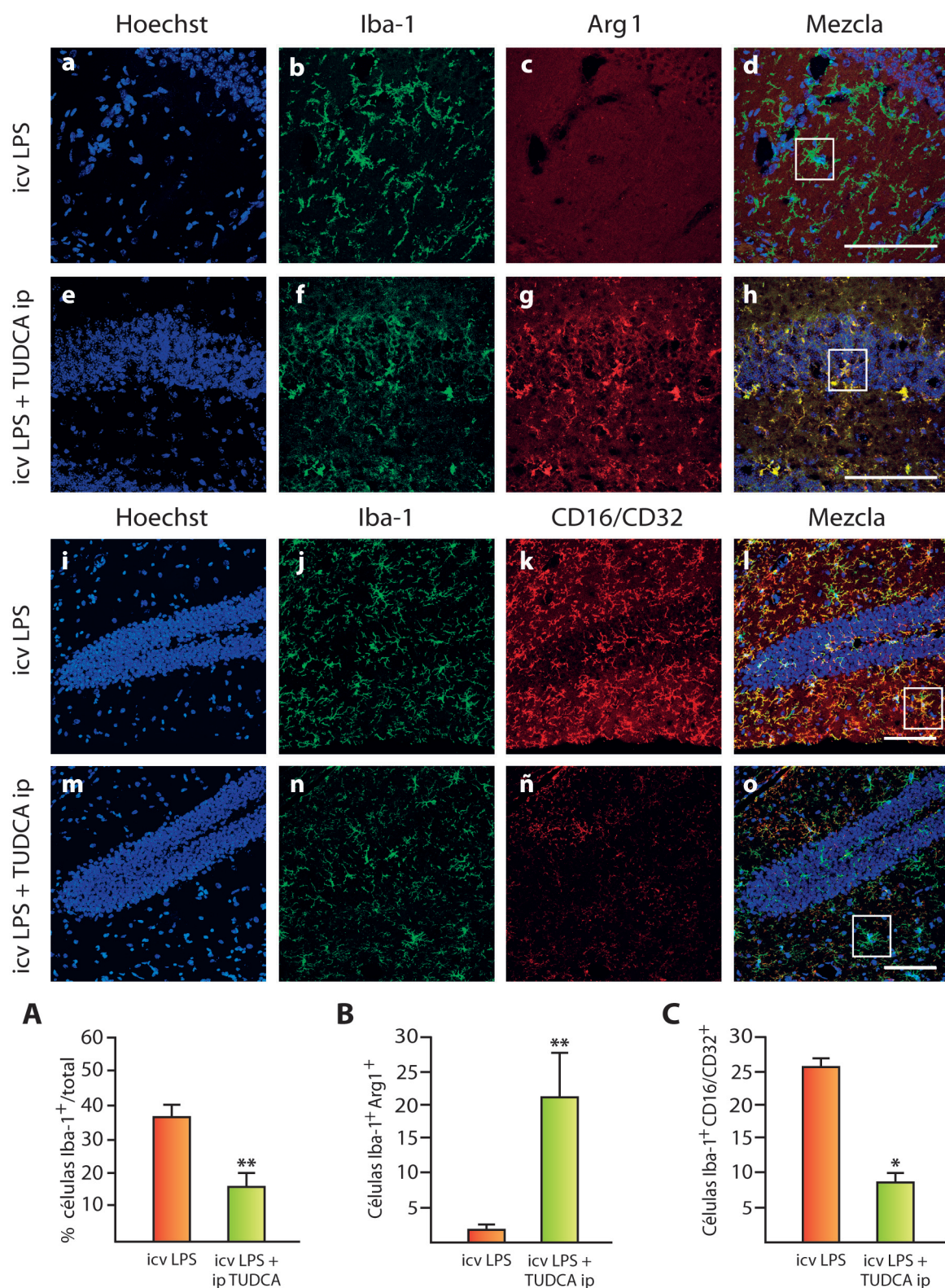


Figura 14. El TUDCA aumenta el fenotipo de microglía M2 y reduce el fenotipo proinflamatorio M1, en el hipocampo de ratones tratados con LPS. Estudiamos los fenotipos de microglía en secciones de hipocampo de ratones tratados con LPS (secciones a-d e i-l) o con LPS y TUDCA ip (secciones e-h y m-o) en el modelo de neuroinflamación de tres días. Se realizó un comarcaje con anticuerpo anti-Iba-1 (marcador de microglía) (b, f, j, n) y CD16/CD32 (marcador de fenotipo M1) (k, ñ) o Arginasa 1 (marcador de fenotipo M2) (c, g). Se analizaron las imágenes obtenidas de 5 secciones por ratón de al menos 7 ratones por grupo experimental. Las gráficas muestran la media \pm EEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ respecto del tratamiento con LPS. Barra de calibración: 50 μ m.

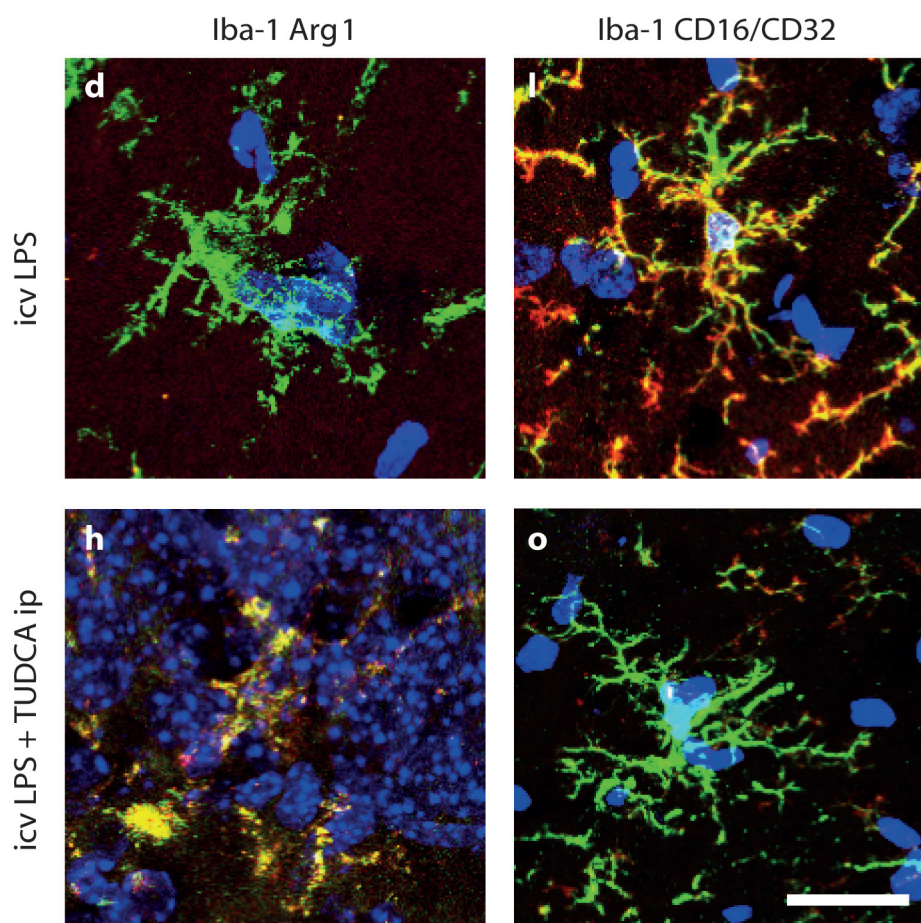


Figura 14b. Ampliación de las regiones seleccionadas. Las microfotografías muestran la colocalización del marcador de microglía Iba-1 (verde) con el marcador Arg1 (d, h) o CD16/CD32 (l, o) (rojo) en el hipocampo de ratones 3 días después de la inyección icv de LPS (d, l) y de ratones tratados con TUDCA tras la inyección icv de LPS (h, o). Barra de calibración 10 μ m.

2.2. Caracterización de marcadores de los fenotipos M1 y M2 en hipocampo de ratón mediante la expresión de ARNm

Los marcadores de fenotipo microglial pro y antiinflamatorio se expresaban claramente en los hipocampos de ratones 3 días después de la icv de LPS. Para cuantificar la expresión de diferentes ARNm de marcadores característicos de ambos fenotipos microgliales, se utilizaron los hipocampos de ratones un día después de la inyección icv de LPS.

Los resultados mostraron que 24 h tras la inyección de LPS hay un incremento en la transcripción génica de los genes proinflamatorios *IL-1 β* , *IL-12 β* , *MCP-1*, *MHCII*, *MIP1 α* y *RANTES* en el hipocampo de los ratones inyectados con LPS (Figura 15). Además, en estos ratones se observa un incremento en la expresión de los ARNm de los genes antiinflamatorios *Arg1*, *IL-4R α* e *IL-10* (Figura 16).

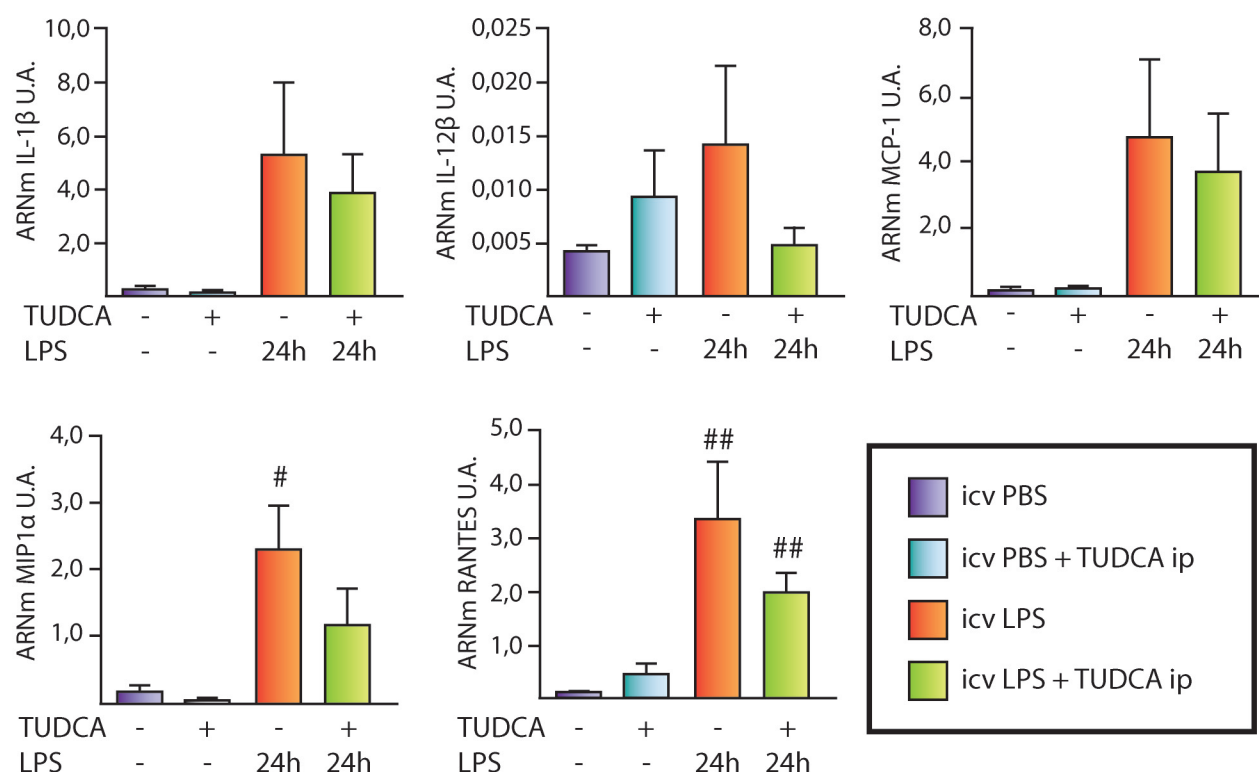


Figura 15. El tratamiento con TUDCA tras la inyección icv de LPS reduce el incremento de los niveles de expresión de marcadores de fenotipo M1 inducidos por la endotoxina en el hipocampo de los ratones. La transcripción de genes marcadores de fenotipo proinflamatorio (*IL-1β*, *IL-12β*, *MCP-1*, *MIP-1α* y *RANTES*) se estudió mediante qPCR del hipocampo de los ratones tratados. Los resultados se representan como la media del ratio de la expresión del gen estudiado respecto de la expresión del gen control endógeno RPS29. Las gráficas representan la media ± EEM de: icv PBS n=6; icv PBS + TUDCA n=7, icv LPS n=9, icv LPS + TUDCA n=10. # p<0,05 y ## p<0,01 respecto del control (icv PBS).

La inyección ip de TUDCA en estos ratones indujo un incremento mayor en el ARNm de los genes antiinflamatorios *IL-4Rα* e *IL-10*, y además indujo la expresión de la esfingosina quinasa 1 (*Sphk1*); sin embargo, el tratamiento con TUDCA no afectó a la transcripción de *Arg1*. En cuanto a los genes proinflamatorios, se observó una reducción parcial en la inducción de los genes estudiados generada por el LPS.

En ninguna de las condiciones experimentales se produjo un incremento en la expresión del ARNm de las citoquinas *IL-4* e *IL-13*. Los experimentos de qPCR realizados con diferentes parejas de cebadores no produjeron ninguna amplificación detectable.

2.3. Efecto del TUDCA en el fenotipo microglial *in vitro*

En el modelo de neuroinflamación *in vivo*, el TUDCA tenía un efecto favorecedor del fenotipo microglial tipo M2. Para analizar el efecto del tratamiento con TUDCA en las células de microglía con mayor detalle, estudiamos el fenotipo microglial en

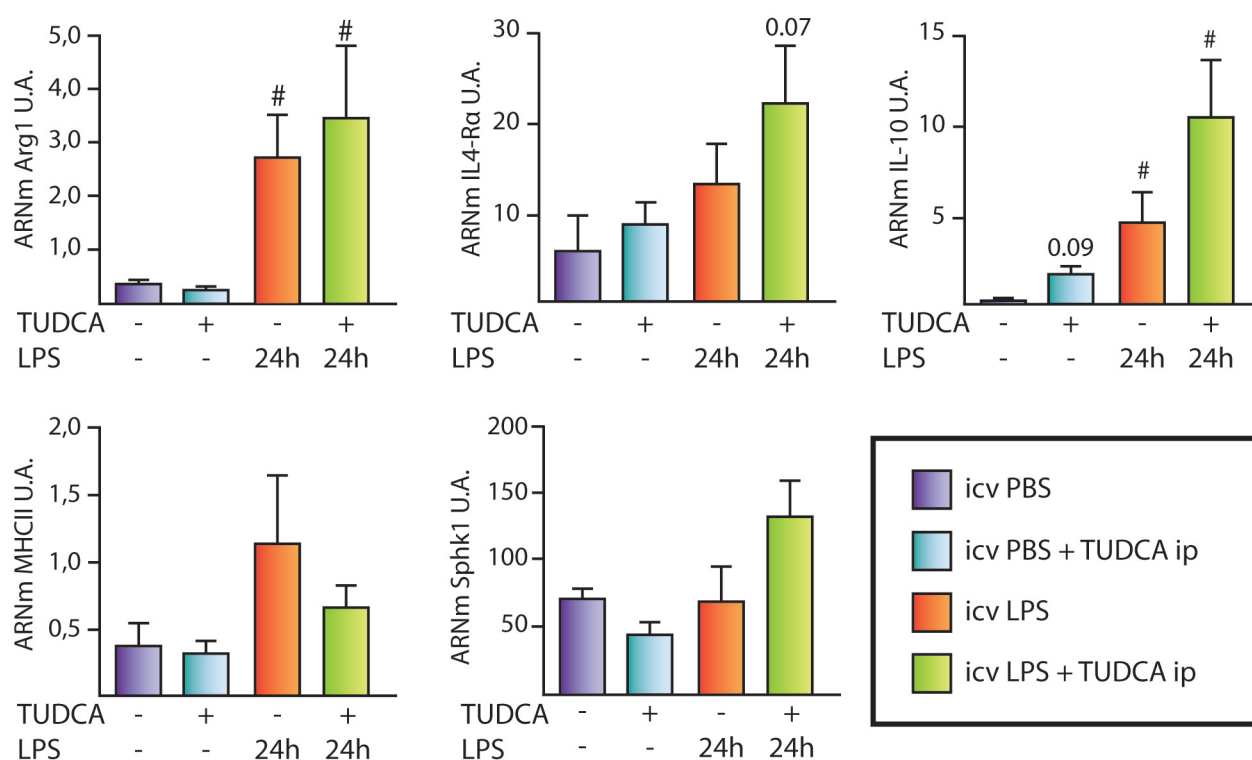


Figura 16. El tratamiento con TUDCA tras la inyección icv de LPS incrementa la expresión de marcadores de microglía M2 en el hipocampo de los ratones. La transcripción de genes marcadores de fenotipo antiinflamatorio (*Arg1*, *IL-4Rα*, *IL-10*, *MHCII* y *Sphk1*) se estudió mediante qPCR del hipocampo de los ratones tratados. Los resultados se representan como la media del ratio de la expresión del gen estudiado respecto de la expresión del gen control endógeno RPS29. Las gráficas representan la media \pm EEM de: icv PBS n=6; icv PBS + TUDCA n=7; icv LPS n=9; icv LPS + TUDCA n=10. # $p < 0,05$ respecto del control (icv PBS).

cultivos primarios de células de microglía *in vitro*. En el estudio de la activación de la vía proinflamatoria, habíamos observado que la expresión de dos marcadores del fenotipo microglial proinflamatorio M1, iNOS y NF κ B, estaba inhibida por el pretratamiento con TUDCA (ver Figura 7 C, E y Figura 8 A, C, E). Para estudiar la activación de las rutas alternativas utilizamos, como primera aproximación, el estudio de la activación del reportero de IL4-Luc como marcador de fenotipo M2. El tratamiento con TUDCA indujo un incremento en la activación del promotor de IL-4 en las células tratadas con LPS respecto de los controles ($p < 0,05$) y de las células tratadas sólo con LPS ($p < 0,001$) (Figura 17 B).

El estudio de la regulación transcripcional por TUDCA de distintos marcadores de microglía M1 y M2. Los resultados mostraron que el TUDCA *per se* no inducía ninguna variación en la transcripción del ARNm en comparación con los controles (Figuras 18 y 19 a-b).

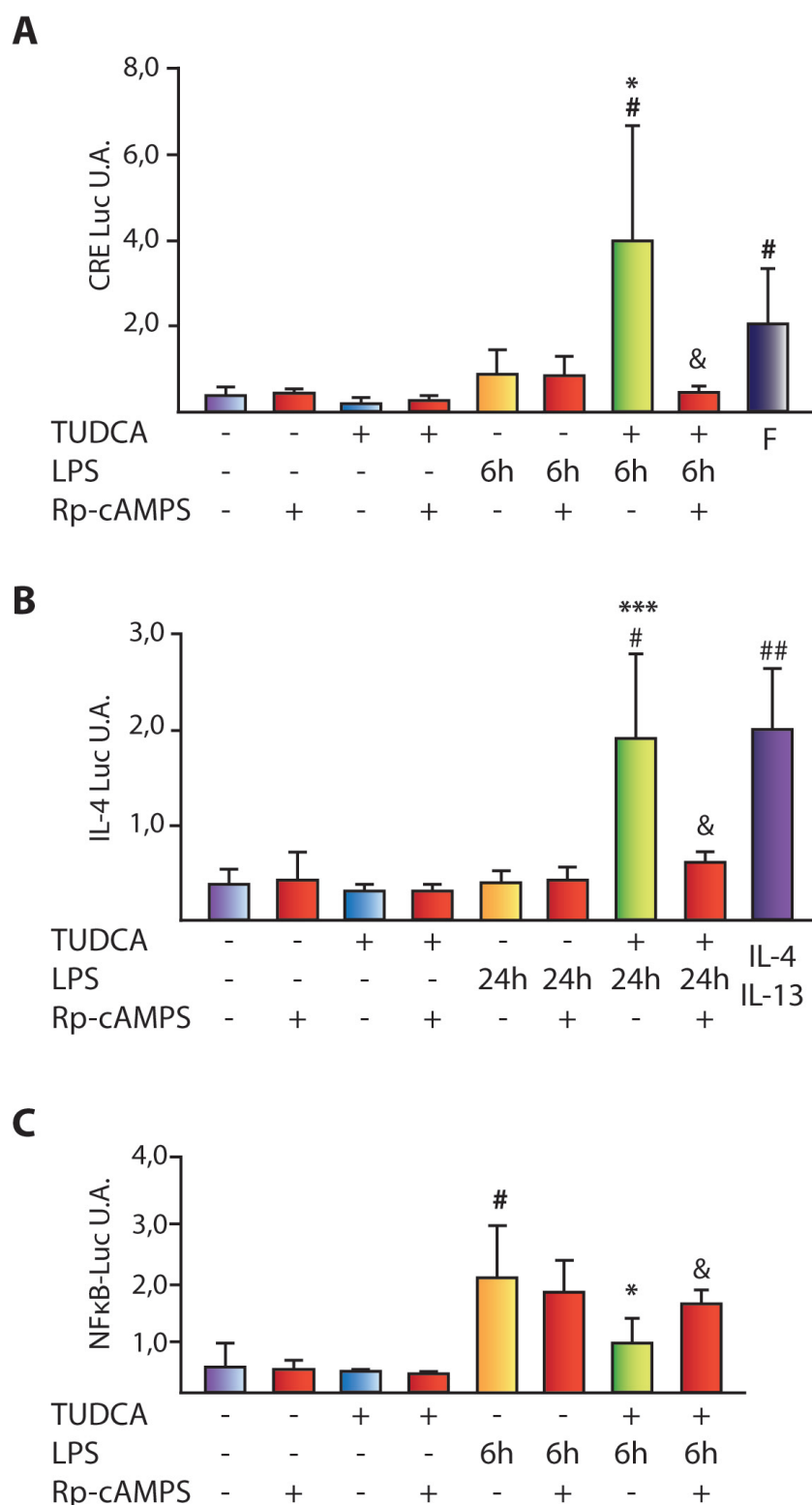


Figura 17. El TUDCA regula la actividad de diferentes reporteros, promoviendo el aumento en los niveles de AMPc. Estudiamos el efecto de los diferentes tratamientos experimentales (LPS 200 ng/mL, TUDCA 200 μ M, Rp-cAMPS 10 μ M, IL-4 e IL-13 10 μ g/mL, Forskolina (F)) así como el de la adición del inhibidor de la PKA (Rp-cAMPS) a los mismos, sobre la activación de plásmidos reporteros de rata CRE-Luc, NF κ B-pGL3 e IL-4-Luc tomando como control de eficiencia de transfección la actividad del plásmido SV40-pRL Renilla. Los resultados muestran la media \pm EEM del incremento respecto del control en al menos 4 experimentos, cada uno por triplicado. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ respecto del control; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ respecto del tratamiento con LPS; & $p < 0,05$ respecto del mismo tratamiento sin Rp-cAMPS.

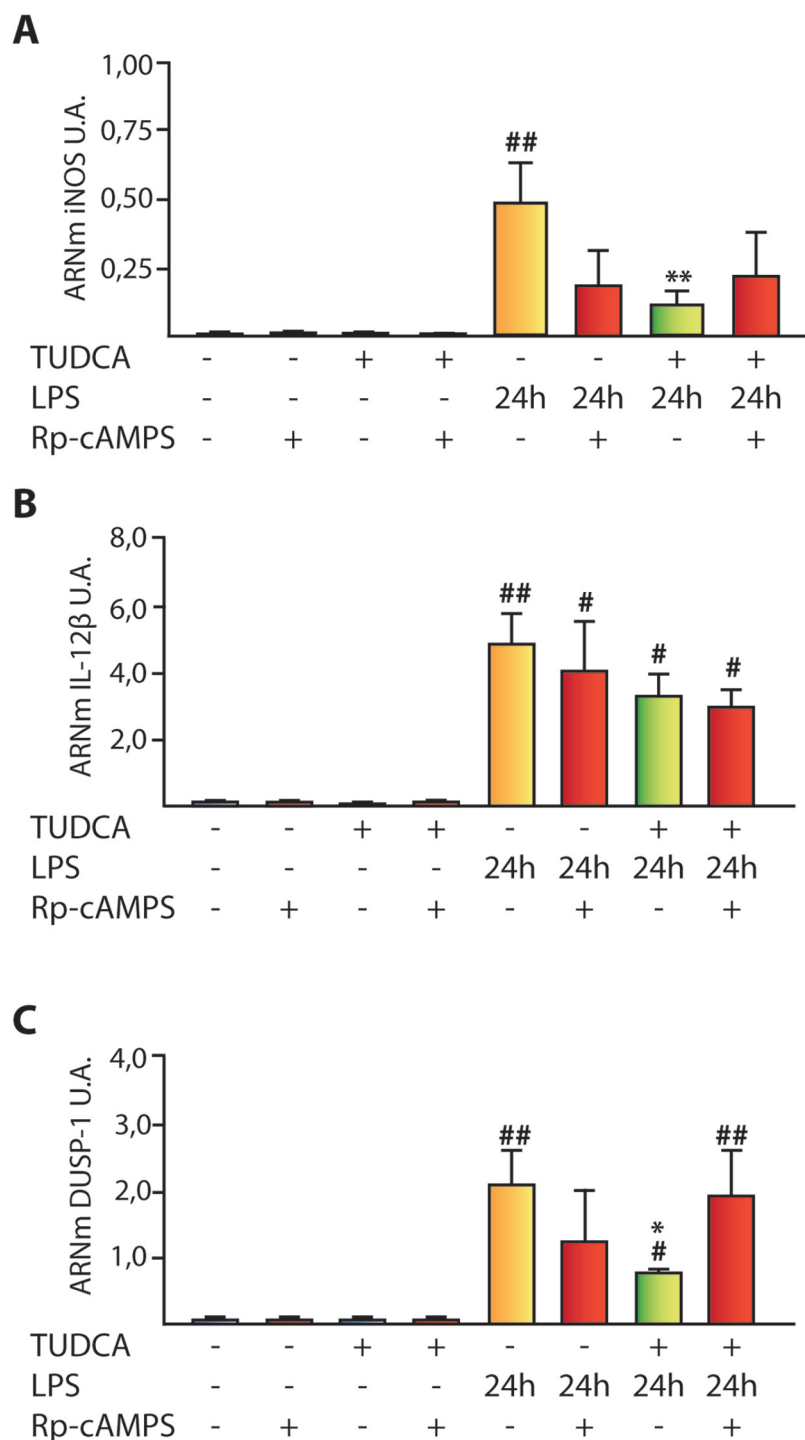
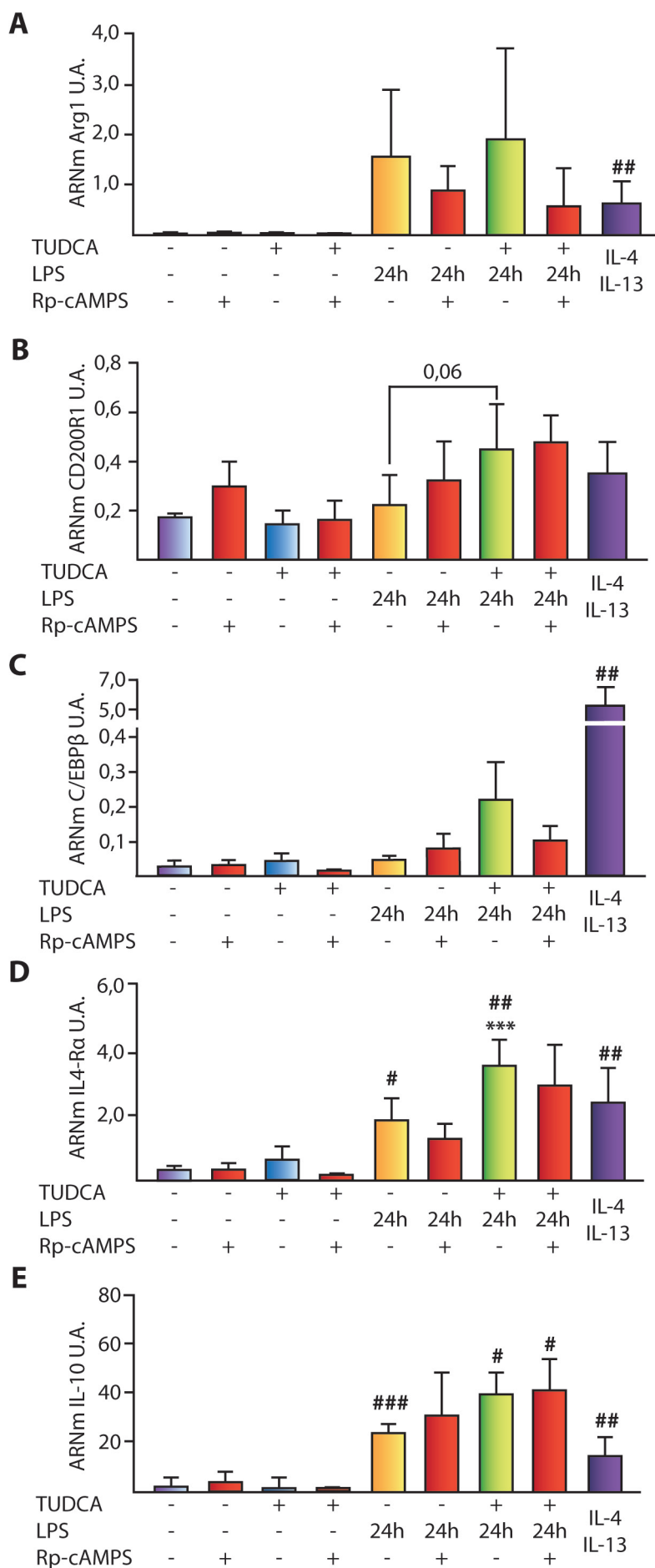


Figura 18. El TUDCA inhibe la transcripción del ARNm de genes de fenotipo proinflamatorio en microglía. El efecto de los diferentes tratamientos experimentales (LPS 200 ng/mL, TUDCA 200 μ M, Rp-cAMPS 10 μ M, IL-4 e IL-13 10 μ g/mL, Forskolina (F)) en la expresión de ARNm de genes característicamente proinflamatorios (*iNOS*, *IL-12 β* y *DUSP-1*), y el efecto del inhibidor de la PKA Rp-cAMPS en esa expresión se determinaron mediante PCR cuantitativa. La expresión de ARNm se midió mediante PCR cuantitativa del ratio entre el ARNm del gen estudiado/ARNm del gen control 36B4. Los resultados muestran la media \pm EEM de al menos 6 experimentos independientes. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ respecto del control; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ respecto del tratamiento con LPS.

a)



b)

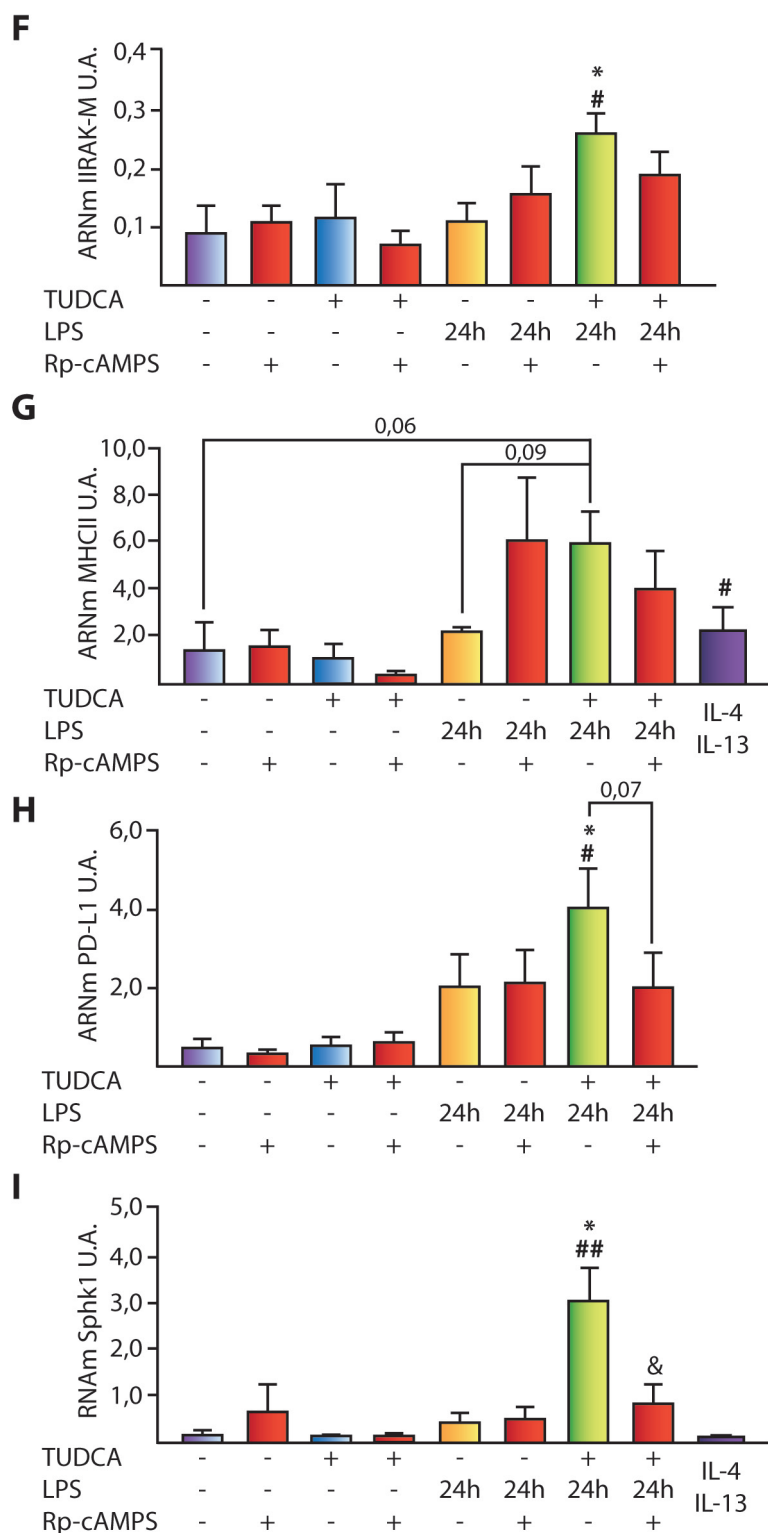


Figura 19 (a-b). La inducción por TUDCA del fenotipo M2 en microglía es parcialmente dependiente de AMPc. El efecto de los diferentes tratamientos experimentales (LPS 200 ng/mL, TUDCA 200 μ M, Rp-cAMPS 10 μ M, IL-4 e IL-13 10 μ g/mL) en la expresión de ARNm de genes característicos del fenotipo microglial antiinflamatorio y el efecto del del inhibidor de la PKA en ellos se determinó mediante PCR cuantitativa. **a)** *Arg1* (A), *CD200R1* (B), *C/EBP β* (C), *IL-4R α* (D), *IL-10* (E), **b)** *IRAK-M* (F), *MHCII* (G), *PD-L1* (H), *Sphk1* (I). La expresión de ARNm se midió mediante PCR cuantitativa del ratio entre el ARNm del gen estudiado/ARNm del gen control *36B4*. Los resultados muestran la media \pm EEM de al menos 6 experimentos independientes. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ respecto del control; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ respecto del tratamiento con LPS; & $p < 0,05$ respecto del mismo tratamiento sin Rp-cAMPS.

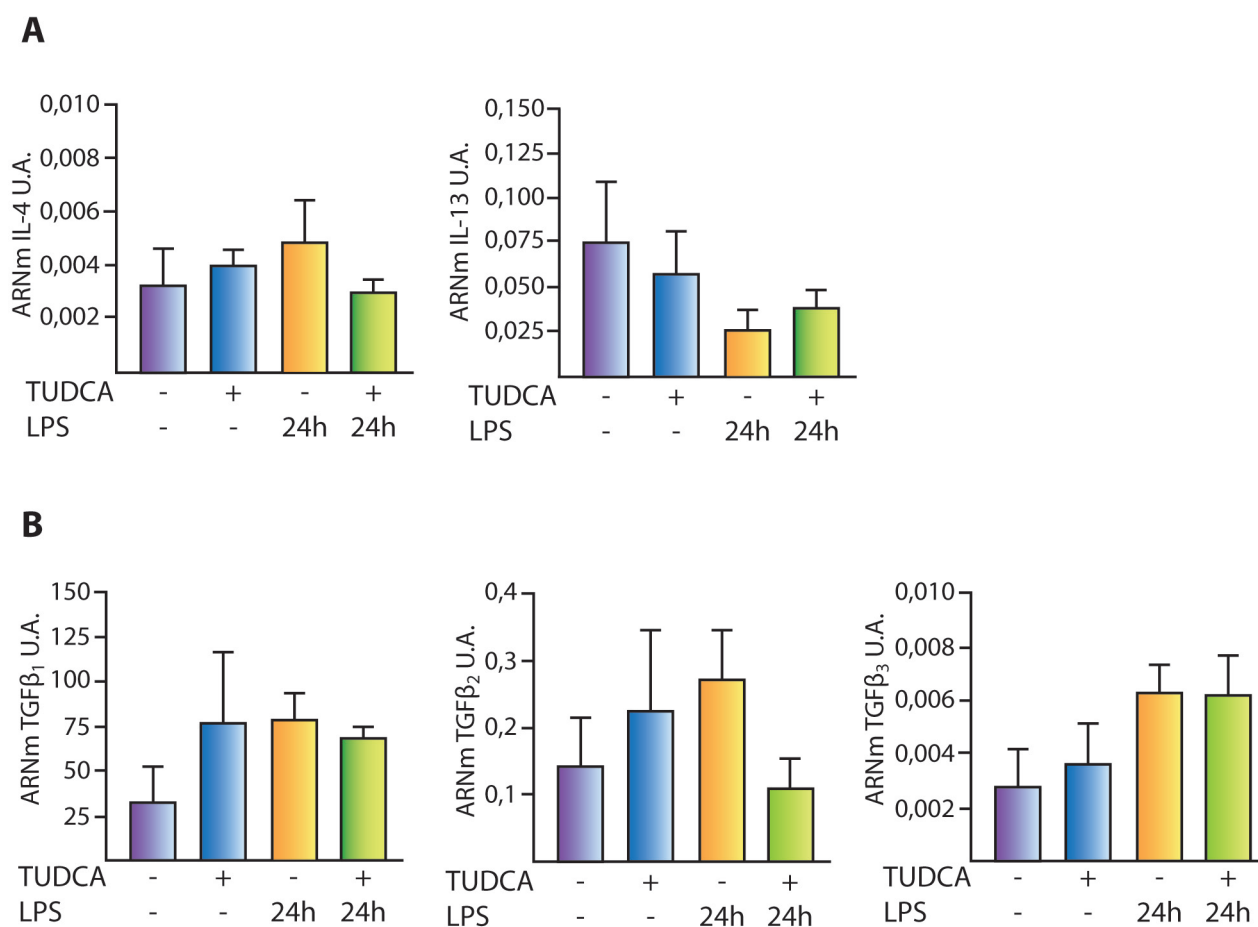


Figura 20. La expresión del ARNm de IL-4, IL-13 y los diferentes isotipos de TGFβ no se modifican en las diferentes condiciones experimentales *in vitro*. El efecto de los diferentes tratamientos experimentales en la expresión de ARNm de genes característicos de la activación alternativa de la microglía *IL-4* e *IL-13* (A) y de los diferentes isotipos de TGFβ (*B*) *TGFβ₁*, *TGFβ₂* y *TGFβ₃* se determinó mediante PCR cuantitativa. La expresión de ARNm se midió mediante PCR cuantitativa del ratio entre el ARNm del gen estudiado/ARNm del gen control 36B4. Los resultados muestran la media ± EEM de al menos 4 experimentos independientes.

El tratamiento con LPS incrementó la transcripción de los genes proinflamatorios *iNOS*, *IL-12β* y *DUSP-1* ($p < 0,01$, en comparación con el tratamiento control en todos los casos). El tratamiento con TUDCA redujo significativamente la inducción del ARNm tanto de la *iNOS* ($p < 0,01$) como de *DUSP-1* ($p < 0,05$) por LPS, pero no la de la *IL-12β* (Figura 18).

En cuanto al fenotipo antiinflamatorio (M2), el tratamiento con LPS incrementó el ARNm de los genes *Arg1*, *IL4Rα* ($p < 0,05$) e *IL-10* ($p < 0,001$) en comparación con la microglía control. La adición de TUDCA a este grupo experimental produjo un incremento no significativo en el ARNm de la *Arg1*, *CD200R1*, *C/EBPβ* y *MHCII* ($p = 0,06$)

con respecto al control. Este incremento resultó significativo en el caso de los ARNm para *IL4Rα* ($p<0,01$), *IL-10* ($p<0,05$), *IRAK-M* ($p<0,05$) y *Sphk1* ($p<0,01$).

La adición de TUDCA en el tratamiento con LPS supuso un incremento en el ARNm de los genes *CD200R1* ($p=0,06$), *IL4Rα* ($p<0,001$), *IRAK-M* ($p<0,05$), *MHCII* ($p=0,09$) y *Sphk1* ($p<0,05$) respecto del tratamiento sólo con LPS (Figura 19 a-b).

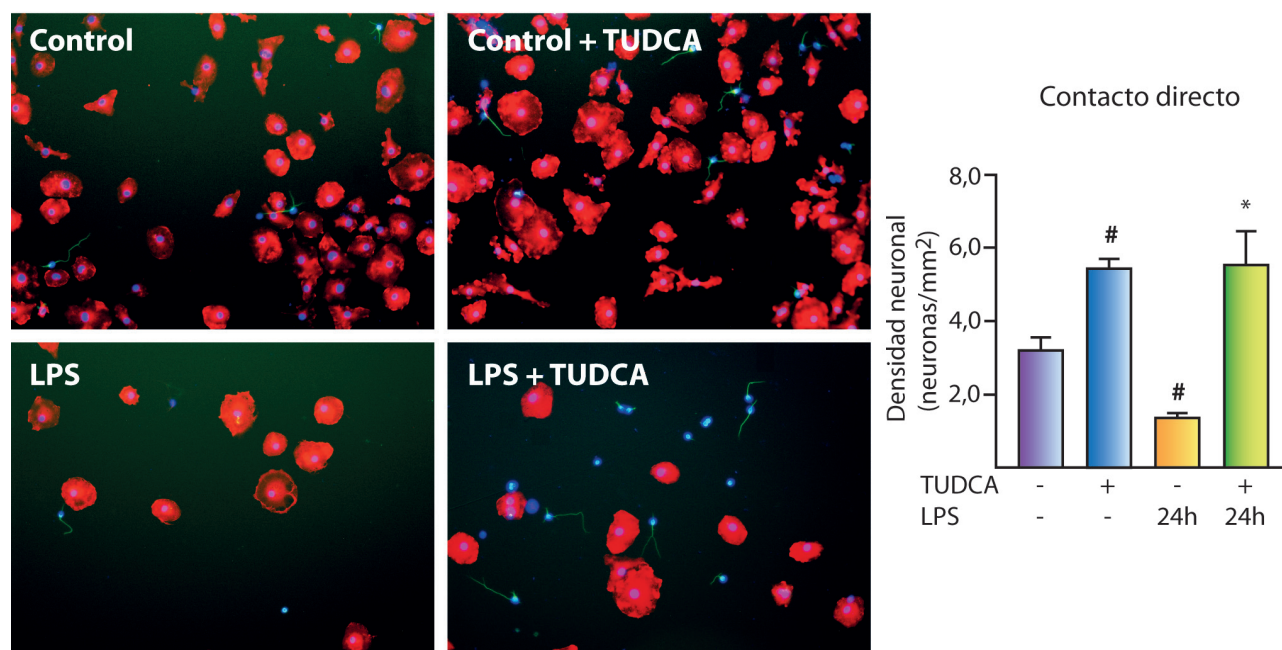
Estos resultados sugieren que el LPS *in vitro* induce un fenotipo microglial principalmente proinflamatorio, y que la adición de TUDCA a estas células hace que el balance de poblaciones tienda hacia un fenotipo antiinflamatorio. Sin embargo, ninguna de las condiciones experimentales incrementó la expresión del ARNm de *IL-4* o *IL-13*, marcadores de la activación alternativa clásica (Figura 20 A).

2.4. Efecto del TUDCA en la supervivencia neuronal *in vitro*

Estudios previos habían demostrado que el TUDCA favorecía la supervivencia neuronal en el SNC (Rodrigues y cols. 2003), pero se desconocía la implicación de las células gliales en esta supervivencia. Para estudiarlo en más detalle, en cocultivos de microglía y neuronas, determinamos el efecto del TUDCA en la muerte neuronal producida por la microglía reactiva, previamente activada con un estímulo proinflamatorio. Las neuronas cocultivadas con microglía tratada con TUDCA mostraron una mayor densidad que las que se habían cocultivado con microglía control ($p<0,05$). La activación microglial inducida por LPS, redujo la supervivencia de neuronas en comparación con los controles ($p<0,05$), pero cuando la microglía había sido pretratada con TUDCA, la supervivencia neuronal fue similar a la los controles ($p<0,05$; Figura 21 A).

Para determinar si este incremento en la supervivencia neuronal era debido a una reducción en la secreción de sustancias neurotóxicas por parte de la microglía o a un contacto directo célula-célula, realizamos un experimento con placas Transwell, de manera que la microglía tratada se encontraba en el pocillo superior, sin posibilidad de migrar a través del poro de la malla, y su efecto sobre las neuronas (sembradas en el pocillo inferior) se vería limitado a factores solubles liberados en el medio de cultivo. En estas condiciones, la microglía tratada con LPS no inducía muerte neuronal, y el tratamiento con TUDCA tampoco tenía ningún efecto (Figura 21 B). Estos resultados sugieren que la microglía requiere un contacto directo con las neuronas para inducir su muerte. El efecto inhibitorio del TUDCA en esta muerte podría ser debido a un incremento transcripcional del *CD200R1* en la microglía (Figura 19a B).

A



B

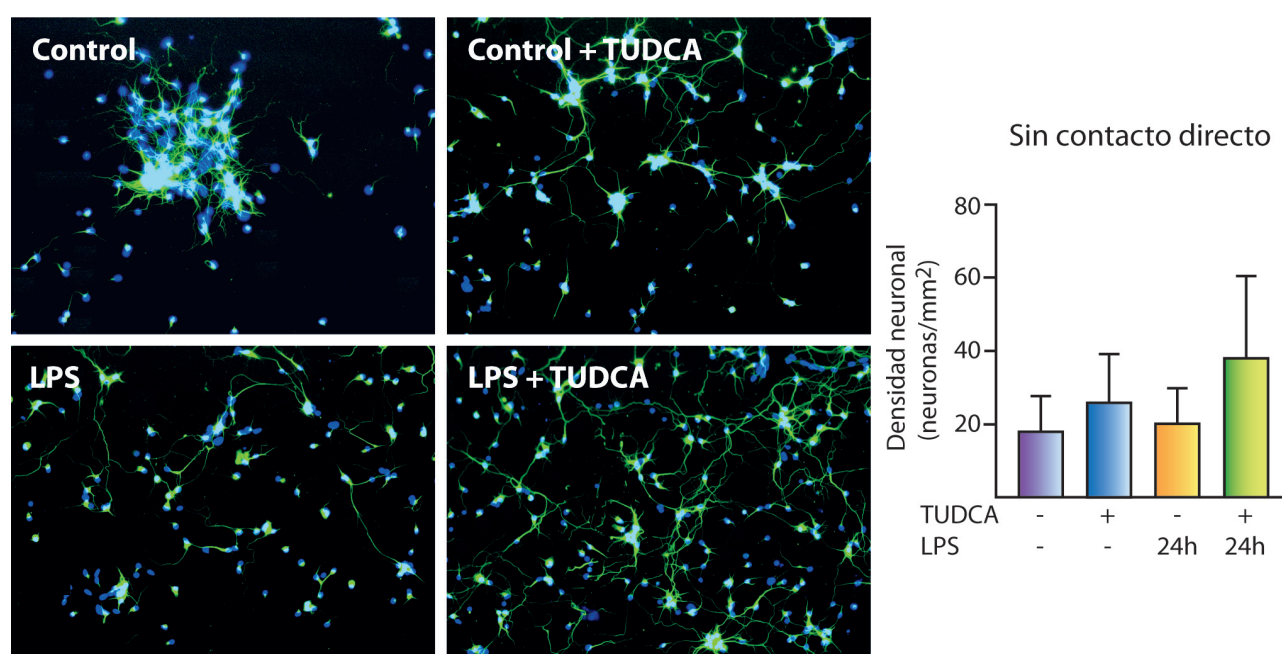


Figura 21. La muerte neuronal producida por microglía activada es inhibida por el tratamiento con TUDCA, cuando existe contacto directo célula-célula. Para determinar el efecto del TUDCA en la supervivencia neuronal, las células de microglía fueron tratadas con LPS en presencia o ausencia de TUDCA. Tras 24 h se retiró el medio y se sembraron las neuronas en OPTIMEM directamente sobre la microglía activada (A) o separadas de la microglía mediante un Transwell (B). Los tipos celulares fueron identificados mediante inmunocitoquímica con marcadores específicos (Iba-1 para microglía, rojo; β -III-tubulina para neuronas, verde; y Hoechst 33342 para núcleos, azul). Los resultados representan la media \pm EEM de al menos 9 campos de 3 experimentos en triplicado. [#] $p < 0,05$ respecto del tratamiento control; ^{*} $p < 0,05$ respecto del tratamiento con LPS.

3. Efecto del TUDCA sobre la respuesta inmune

Como hemos citado en la Introducción, la neuroinflamación está determinada por la activación de las células residentes en el cerebro, pero viene también acompañada de una activación del sistema inmune central. Puesto que el TUDCA tenía un efecto directo sobre la microglía, y en la regulación de la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio de la BHE y en la secreción de quimioquinas que facilitan la infiltración de células ajenas al SNC, decidimos estudiar su efecto en la respuesta inmune periférica, centrándonos en el estudio de las poblaciones de monocitos y linfocitos T CD4⁺ y Treg.

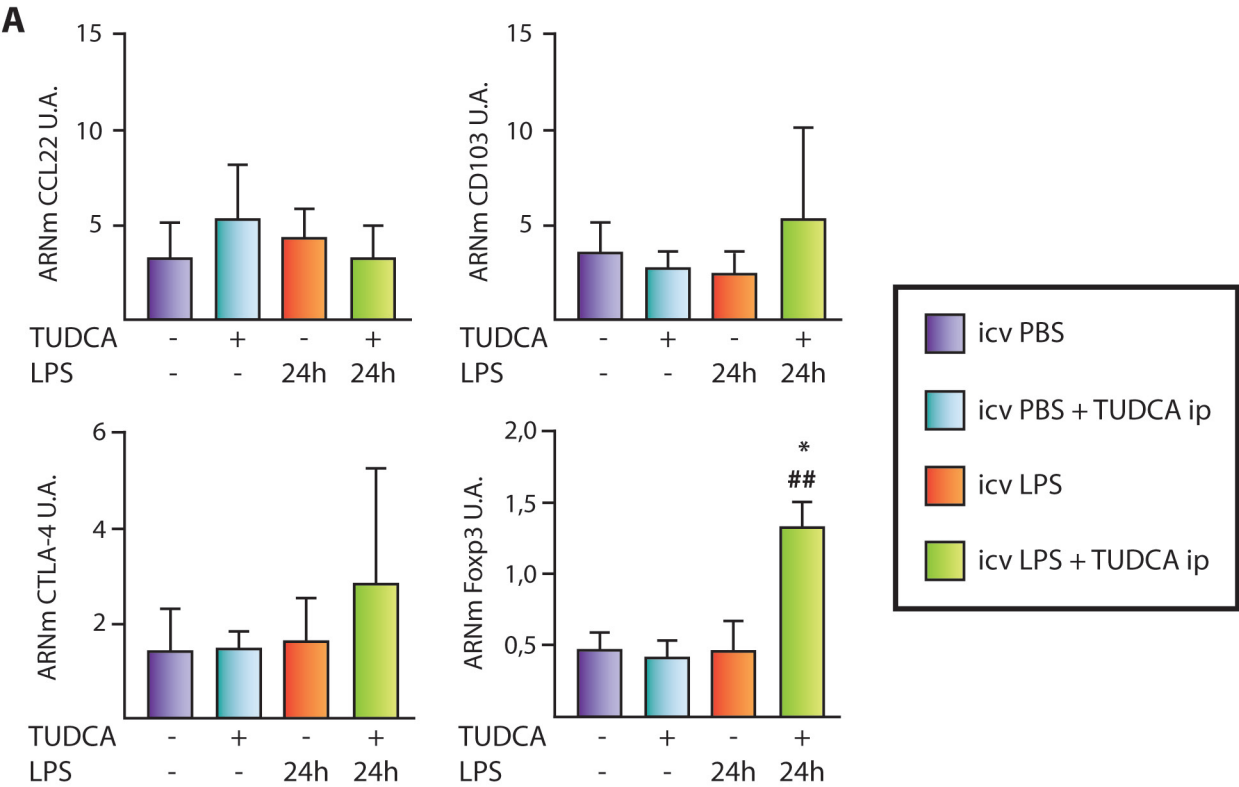
3.1. Expresión de ARNm en el hipocampo de ratón

Como primera aproximación al estudio de la expresión general de genes proinflamatorios y su posible regulación por TUDCA, estudiamos la expresión en el hipocampo de ratones inyectados icv LPS, 24 h antes de su sacrificio y tratados o no con TUDCA, del ARNm de cuatro genes implicados en la regulación de la respuesta linfocitaria: CCL22 (una quimioquina secretada por la microglía para atraer linfocitos Treg a la zona dañada), CTLA-4 (un receptor de membrana de linfocitos T inhibidor de la función de linfocitos T tras su activación), CD103 (la integrina αE , expresada por poblaciones de linfocitos reguladores Foxp3⁺) y el factor de transcripción Foxp3 (marcador de linfocitos Treg) en el hipocampo de ratones inyectados icv con LPS 24 h antes de su sacrificio y tratados o no con TUDCA.

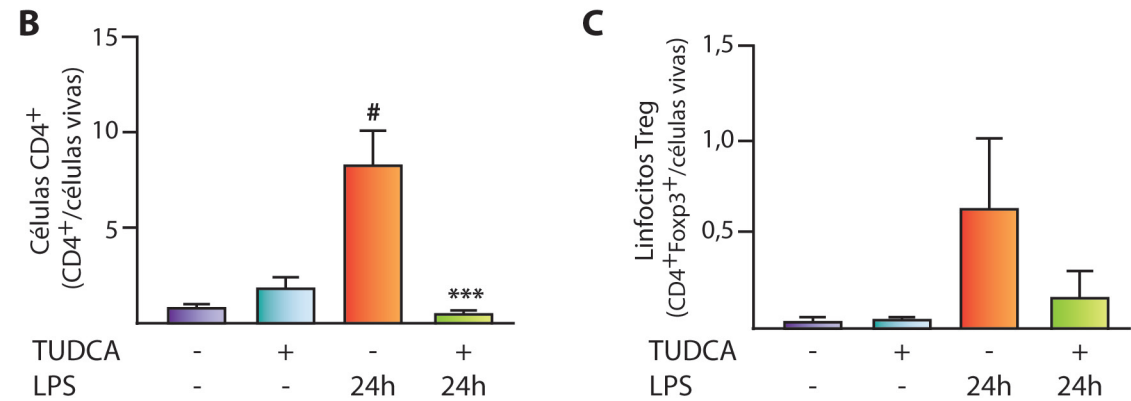
En el análisis de la expresión de ARNm no se apreciaron cambios en la expresión de *CCL22*, *CD103* ni *CTLA-4*. Sin embargo, el ARNm de *Foxp3* sufrió un marcado incremento tras el tratamiento con TUDCA y LPS, tanto con respecto a los ratones control como a los tratados con LPS ($p < 0,05$ en ambos casos; Figura 22 A).

3.2. Linfocitos

El factor de transcripción Foxp3 regula la diferenciación de linfocitos CD4⁺ a linfocitos T reguladores. El incremento en el mensajero de Foxp3, medido por qPCR en el hipocampo de los ratones inyectados con LPS y TUDCA, sugiere un aumento en la población de linfocitos Treg. Sin embargo, el estudio del infiltrado de linfocitos CD4⁺ y Treg en el parénquima cerebral mostró que la inyección icv de LPS incrementó significativamente el infiltrado de linfocitos CD4⁺ ($p < 0,05$), y éste se redujo en los ratones tratados con TUDCA ($p < 0,001$; Figura 22 B). Asimismo, tras la inyección de LPS, apreciamos un aumento en la población de células CD4⁺Foxp3⁺, aunque este aumento no resultó estadísticamente significativo, y no se observó en el resto de grupos experimentales (Figura 22 C).



Infiltrado linfocitos CD4 en cerebro a 1 día



Ganglios linfáticos cervicales

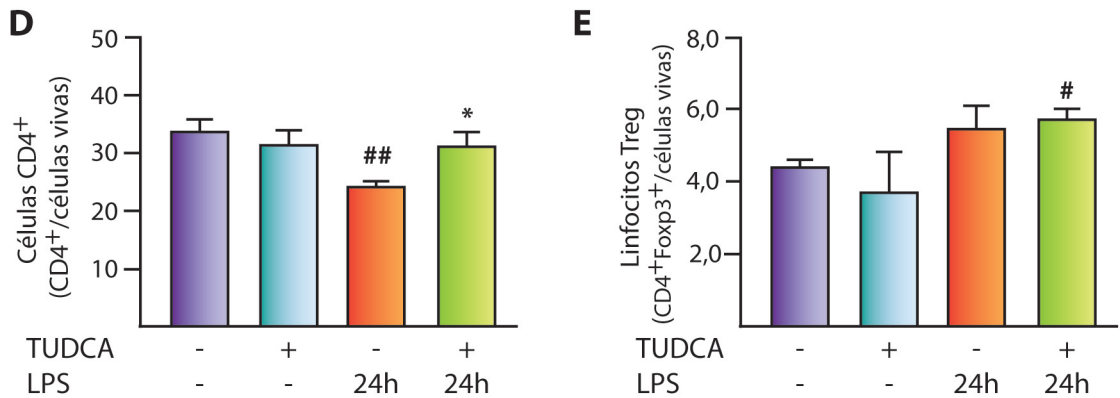


Figura 22. El TUDCA reduce el infiltrado de linfocitos CD4⁺ inducido por la icv LPS en el parénquima cerebral. (A) La expresión de ARNm de *CCL22*, *CD103*, *CTLA-4* y del factor de transcripción *Foxp3* se determinó mediante PCR cuantitativa y se representó como el ratio entre el ARNm del gen/ARNm del control endógeno RPS29. Las poblaciones de linfocitos CD4⁺ y Treg se caracterizaron mediante citometría de flujo en tejido cerebral (B) y en ganglios linfáticos cervicales (C). Los resultados gráficos muestran la media \pm EEM de al menos 5 ratones por grupo experimental para el ARNm de hipocampus; y los resultados de citometría corresponden a 3 animales control, 4 controles con TUDCA, 5 icv LPS y 5 icv LPS con TUDCA. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ respecto del control; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ respecto del tratamiento con LPS.

Estudiamos, además, estas mismas poblaciones en los ganglios linfáticos cervicales, ya que son estas estructuras de donde parten los linfocitos y donde se produce la presentación de antígeno antes de entrar en el SNC (Ransohoff and Engelhardt 2012). En ratones tratados con LPS, la población de linfocitos CD4⁺ en los ganglios cervicales era menor que en los ganglios de los ratones tratados con LPS y TUDCA ($p < 0,01$; Figura 22 D). Además, en los ratones tratados con LPS y TUDCA ip, observamos un incremento de los linfocitos Treg respecto a los ganglios cervicales de ratones control ($p < 0,05$; Figura 22 E).

4. Evaluación del efecto del tratamiento con TUDCA en la vía del TGF β

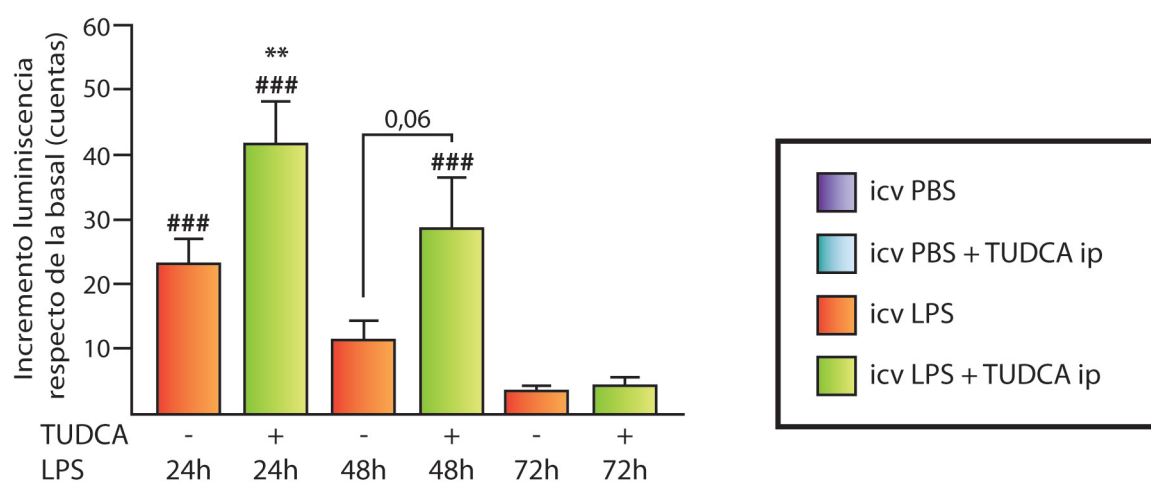
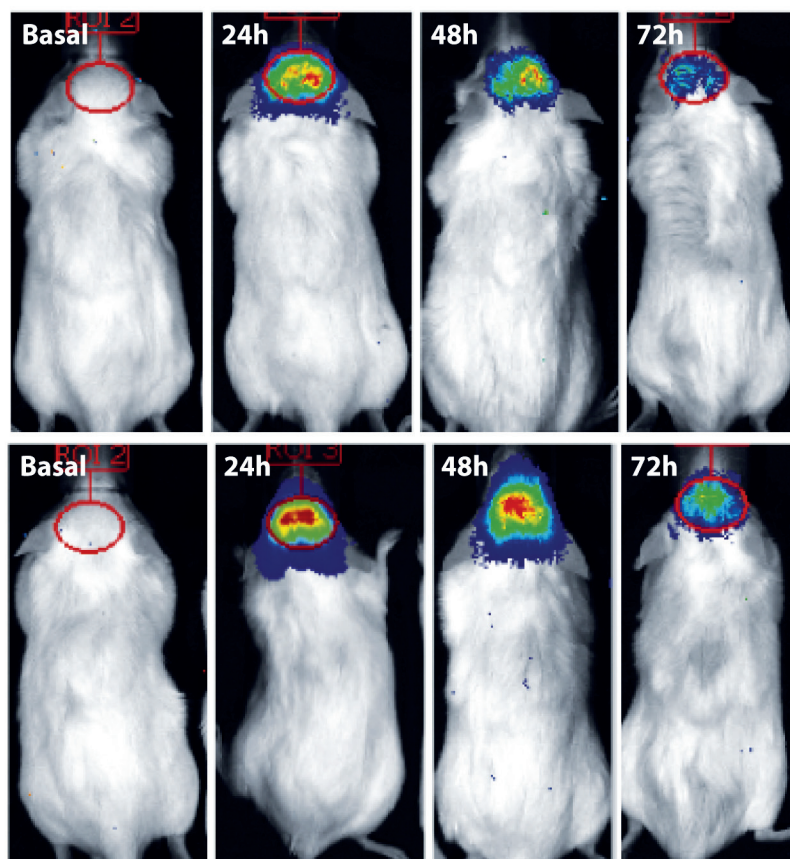
4.1. Activación de la vía del TGF β en ratones transgénicos SBE/Tk-Luc

La activación del receptor de TGF β induce la fosforilación de las proteínas Smad2 y Smad3, que se translocan al núcleo para regular la transcripción génica mediante su unión a elementos de unión a Smad (SBE, Smad binding elements). Estudios previos han demostrado que los ratones transgénicos SBE/Tk-Luc son un modelo excelente para estudiar el curso temporal y la especificidad de tejido de la activación de la cascada de señalización Smad2/3 en ratones, así como la activación de la vía de TGF β tras la inyección de LPS o el daño cerebral (Lin y cols. 2005, Luo y cols. 2006).

La activación del reportero de la vía del TGF β específica en cerebro se estudió cuantificando la emisión de luminiscencia tras inyectar LPS iv a ratones transgénicos SBE/Tk-Luc, tratados o no con TUDCA (Lin y cols. 2005, Luo y cols. 2006).

La inyección iv de LPS causaba un marcado aumento en la activación de la vía de TGF β ($p < 0,001$), que decaía a lo largo de los tres días posteriores (Figura 23 A). Sin embargo, la inyección ip de TUDCA, producía un incremento significativamente mayor en la activación de esta vía a las 24 h ($p < 0,001$ con respecto del control y $p < 0,01$ con respecto a los ratones inyectados con LPS) que se mantenía a las 48 h ($p < 0,001$) para decaer a las 72 h.

A



B

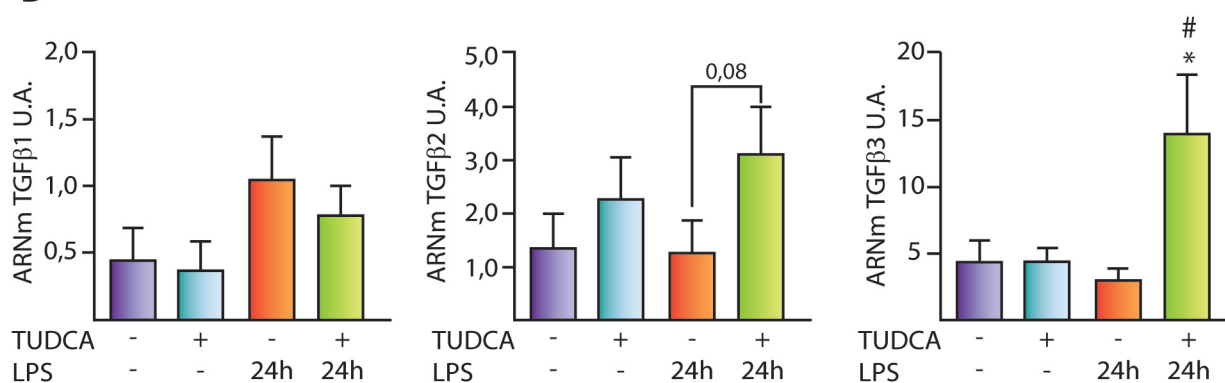


Figura 23. El LPS activa la vía de Smad2/3-TGF β específicamente en cerebro y el TUDCA incrementa esta activación. A) La activación específica de tejido de la vía de Smad2/3-TGF β tras la administración de LPS iv se midió mediante la detección de bioluminiscencia en ratones transgénicos. Las gráficas muestran la media \pm EEM del incremento en luminiscencia con respecto a la luminiscencia basal propia de cada individuo en unidades arbitrarias, en 12 individuos a los que se inyectó LPS iv y 11 que además recibieron TUDCA ip. B) Cuantificación de la transcripción génica de los diferentes isotipos de TGF β , estudiado mediante qPCR en los hipocampos de ratones tratados según el protocolo de icv LPS de 1 día. Los resultados se recogen como la media del ratio de la expresión del gen estudiado con respecto al gen control endógeno RPS29. Las gráficas representan la media \pm EEM de: icv PBS n=6; icv PBS + TUDCA n=7, icv LPS n=9, icv LPS + TUDCA n=10. # p<0,05; ### p<0,001 respecto del control y * p<0,05; ** p<0,01 con respecto del tratamiento con LPS.

4.2. Caracterización de los isotipos de TGF β implicados

La máxima diferencia en la activación de la ruta del TGF β en los ratones transgénicos aparecía a las 24 h. Por ello, estudiamos la expresión de las tres isoformas de TGF β mediante la cuantificación del ARNm de las mismas en los hipocampos de ratones 1 día tras ser inyectados con LPS.

La inyección con LPS produjo un leve incremento en el ARNm para TGF β_1 , mientras que no alteraba la expresión de los isotipos 2 ni 3 (Figura 23 B). El tratamiento adicional de estos ratones con TUDCA, indujo un leve incremento en el ARNm para TGF β_2 (p=0,08 respecto a los ratones inyectados con LPS), y un pronunciado incremento del de TGF β_3 (p<0,05 tanto con respecto a los ratones control como a los inyectados con LPS).

Debido al marcado incremento en la expresión del ARNm para TGF β_3 , decidimos determinar si este aumento transcripcional se traducía en una mayor expresión de la proteína en tejido, y si esta era una respuesta generalizada en el parénquima cerebral o si estaba restringida a la región del hipocampo. Para ello realizamos una caracterización inmunohistoquímica de la expresión de TGF β_3 en diferentes regiones cerebrales: hipocampo, cuerpo calloso y cortezas frontal y temporal, en los modelos de icv LPS tras 1 y 3 días.

La inyección de LPS sólo produjo un incremento en la expresión de TGF β_3 en el hipocampo de los ratones, que no llegaba a ser estadísticamente significativo (Figura 24). Sin embargo, el tratamiento con TUDCA tras la icv de LPS produjo un incremento significativo en la expresión de TGF β_3 en todas las áreas cerebrales estudiadas, en el modelo de icv LPS de 3 días (p<0,05 en la corteza frontal y p<0,01 en el resto de áreas estudiadas, con respecto al control, y p<0,05 en la corteza temporal y p<0,01 en el resto de áreas estudiadas, con respecto a los ratones inyectados únicamente con LPS).

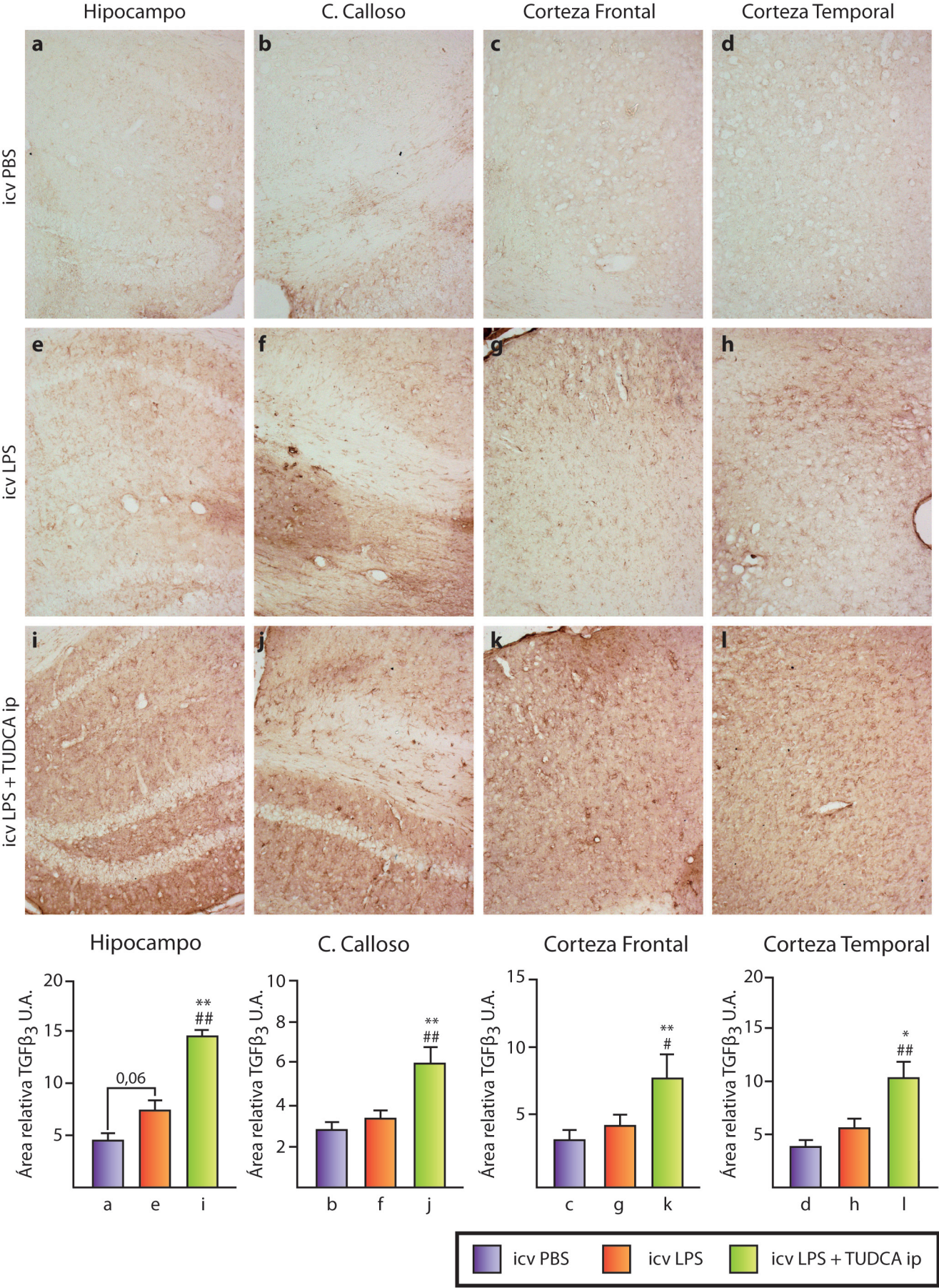


Figura 24. El tratamiento con TUDCA tras la icv de LPS produce un incremento en la expresión de $TGF\beta_3$ en diferentes regiones cerebrales. Fotomicrografías de microscopía óptica (20x) representativas de secciones coronales de 15 μm de grosos. Las gráficas de barras muestran la expresión media \pm EEM de $TGF\beta_3$ en el hipocampo, cuerpo calloso, cortezas frontal o corteza temporal de al menos 5 secciones de 6 animales por grupo. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ respecto del control (icv PBS) y * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto del tratado con LPS.

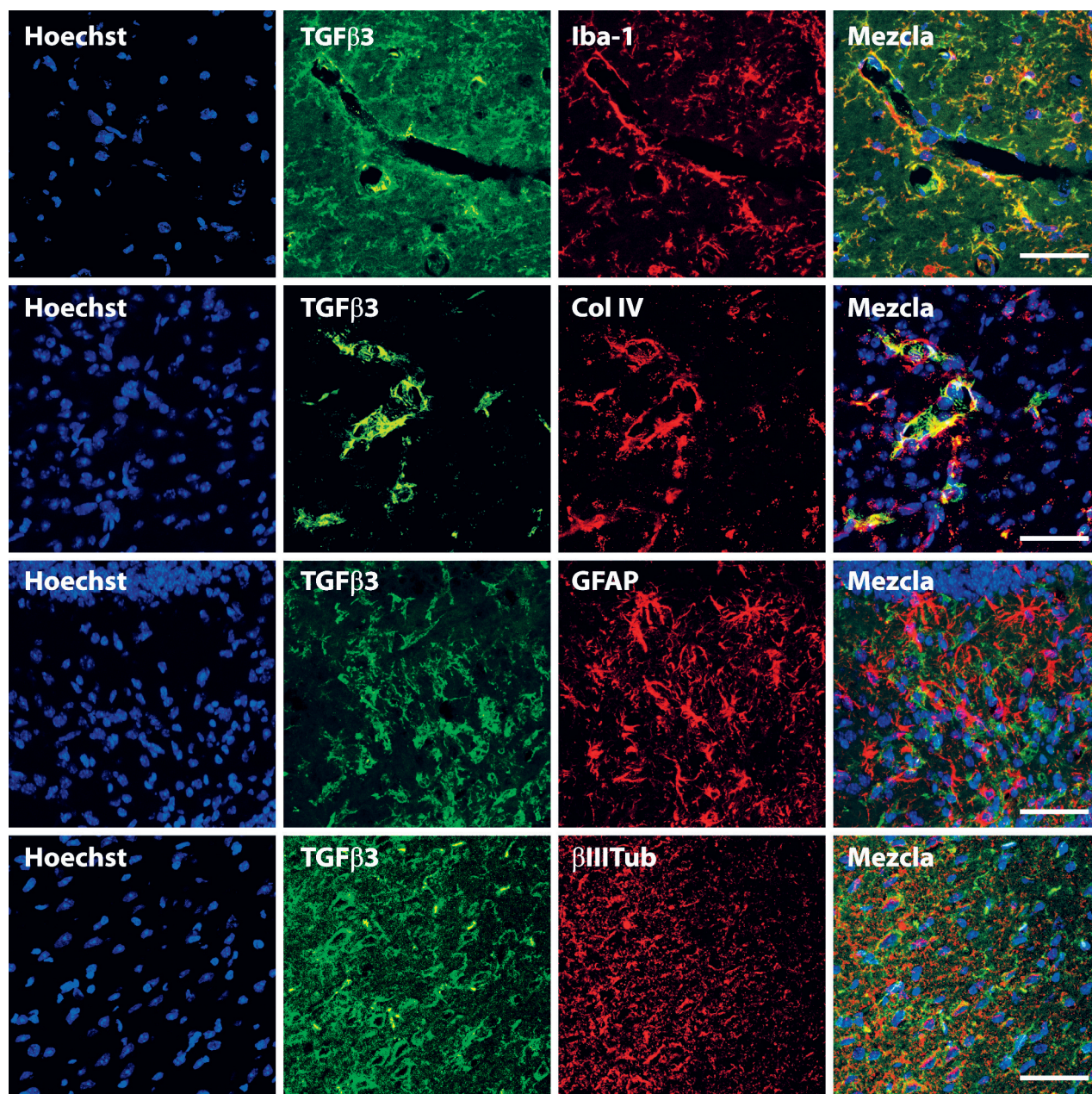


Figura 25. El TUDCA induce la expresión de $TGF\beta_3$ en microglía, células endoteliales y neuronas de ratones tratados con LPS, pero no en astrocitos. La expresión de $TGF\beta_3$ en los diferentes tipos celulares fue caracterizada mediante colocalización del marcador $TGF\beta_3$ (verde) con Iba-1 para células microgliales, Colágeno IV (Col IV) para endoteliales, GFAP para astrocitos y β -III-tubulina para neuronas. Barra de calibración 100 μm .

Con el fin de caracterizar los tipos celulares responsables de esta respuesta, realizamos una colocación de $\text{TGF}\beta_3$ con diferentes marcadores celulares. Los resultados mostraron que tanto la microglía como las células endoteliales y las neuronas (aunque estas últimas en menor medida) expresaban $\text{TGF}\beta_3$, mientras que los astrocitos no (Figura 25).

5. Modo de acción del TUDCA

5.1. El TUDCA incrementa los niveles de AMPc en la microglía en cultivo

La unión de sales biliares al receptor GPBAR1 (el receptor de sales biliares acoplado a proteínas G 1), también conocido como TGR5, induce la producción del segundo mensajero intracelular AMPc mediante la activación de la adenilato ciclasa a través de $\text{Gs}\alpha$. Por ello, estudiamos si el tratamiento de la microglía con la sal biliar TUDCA causaba un aumento en los niveles de AMPc. El TUDCA *per se* indujo un ligero incremento en los niveles de AMPc 3 h y 6 h tras el tratamiento (Figura 26 A-B), al igual que el LPS. Sin embargo, la combinación de LPS con TUDCA causó un considerable aumento en la producción de AMPc, mucho más que cada estímulo por separado.

Para determinar el patrón temporal del aumento del AMPc, transfectamos la microglía con un plásmido reportero con elementos de respuesta a AMPc (CRE-Luc). Los resultados mostraron un pico de inducción del reportero, 2 h tras la adición de TUDCA, 10 veces superior al control de inducción del reportero, y otro pico a las 3 h (Figura 26 C). El tratamiento con LPS inducía un ligero incremento del reportero de tres veces respecto del control a las 2 h, que decaía a las 3 h y reaparecía a las 4 h y 6 h. Sin embargo, cuando se trataba la microglía con la combinación de LPS y TUDCA, se reproducía el pico inducido con LPS a las 2 h, pero había un incremento significativo de más de diez veces con respecto al control a las 6 h (Figura 26 D).

La activación del reportero inducida por TUDCA desaparecía tras el tratamiento con el inhibidor de la PKA (Rp-cAMPs), demostrando que esta inducción era dependiente de AMPc en los diferentes tratamientos (Figura 26 C y D).

5.2. Papel del AMPc en la regulación del fenotipo microglial *in vitro*

Para determinar la importancia del AMPc en la inducción del fenotipo microglial M2 por TUDCA, estudiamos el efecto del inhibidor de la PKA, Rp-cAMPs, en la activación de plásmidos reporteros en cultivos de microglía.

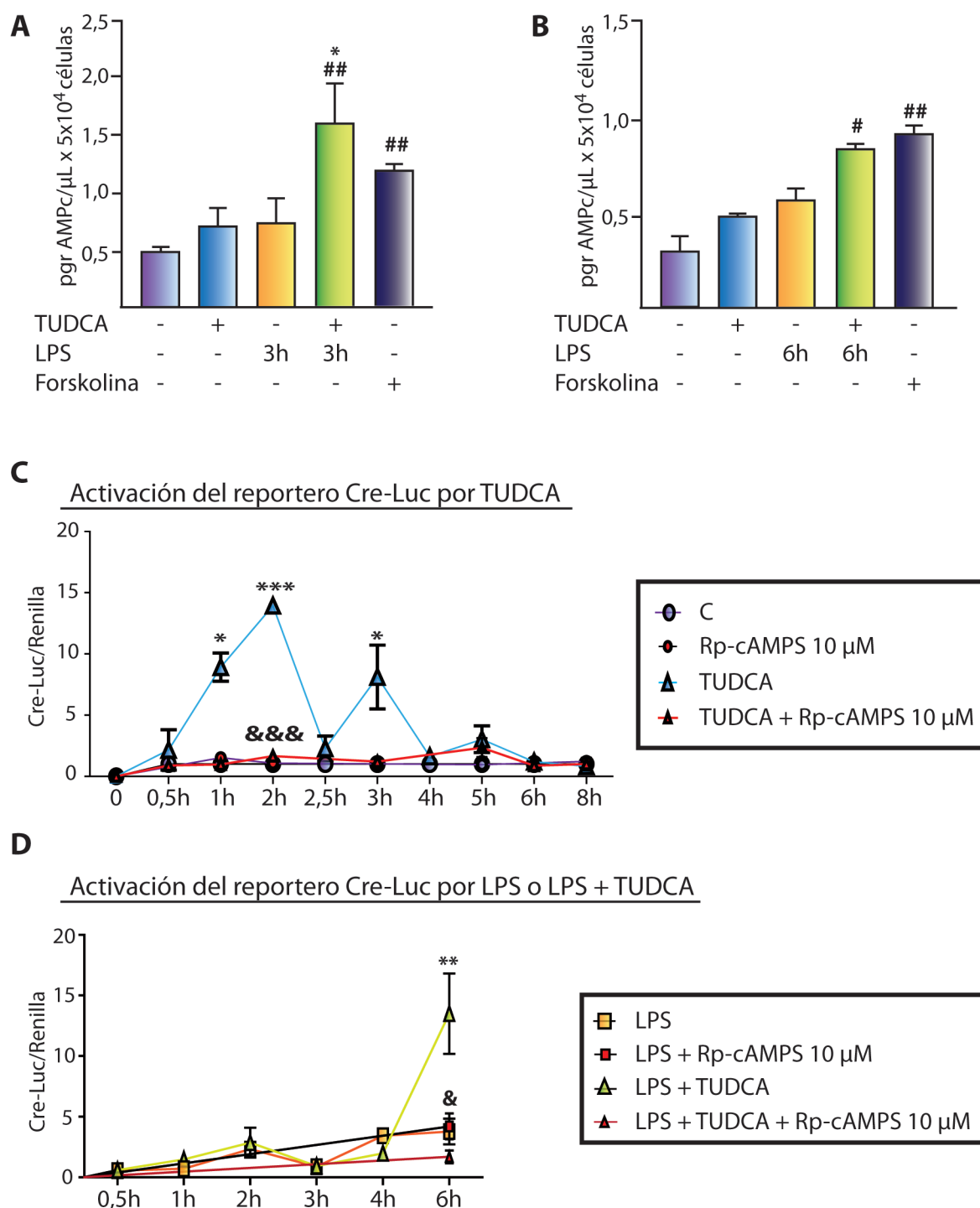


Figura 26. El TUDCA induce la producción de AMPc en microglía. La secreción de AMPc se estudió en células de microglía 3 h (A) y 6 h (B) tras el tratamiento con LPS y/o TUDCA. Los resultados muestran la media \pm EEM de picogramos de AMPc/ μ L producidos por 50.000 células en al menos tres experimentos independientes. Determinamos la activación del reportero CRE-Luc por el TUDCA (C) o la combinación del estímulo proinflamatorio con el TUDCA (D). Las gráficas muestran la media \pm EEM de 4 experimentos independientes por cuadruplicado. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ respecto del control; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ respecto del tratamiento con LPS. La dependencia de la activación del reportero del AMPc se estudió con el tratamiento de las células con el inhibidor de la PKA Rp-cAMPS (& $p < 0,05$, &&& $p < 0,001$ respecto del mismo tratamiento sin Rp-cAMPS).

La inhibición de la PKA reducía significativamente la activación del reportero con elementos de respuesta a AMPc (Figura 17 A). Además, la inhibición se traducía en un incremento de la activación del reportero de NFκB en el tratamiento con LPS y TUDCA (Figura 17 B), así como en una reducción en la activación del reportero de IL-4 inducida por ese tratamiento en la ausencia del inhibidor (Figura 17 C).

A continuación, examinamos cómo afectaba el Rp-cAMPS a la expresión de los ARNm en la microglía. La inhibición de la PKA no afectaba a la expresión de los mensajeros de los genes proinflamatorios *iNOS* e *IL-12β*, pero sí que producía una reversión de la inhibición del ARNm de *DUSP-1* en la microglía tratada con LPS y TUDCA (Figura 18).

En cuanto a los ARNm de los genes antiinflamatorios, el tratamiento con Rp-cAMPS sólo inhibió significativamente el ARNm de la *Sphk1* ($p < 0,05$). Sin embargo, redujo parcialmente la inducción transcripcional de los mensajeros de *Arg1*, *C/EBPβ*, *IRAK-M* y *MHCII* promovida por el tratamiento LPS y TUDCA, aunque la inhibición no fue significativa en ninguno de los casos (Figura 19 a-b).

Esto sugiere que el AMPc podría mediar la inducción por TUDCA del fenotipo antiinflamatorio de la microglía en condiciones de inflamación, porque el inhibidor de la PKA bloquea, aunque sea parcialmente, la activación génica y la inducción en la expresión de ARNm de varios marcadores del fenotipo antiinflamatorio de la microglía.

5.3. Identificación del receptor del TUDCA

La expresión de GPBAR1/TGR5 ha sido descrita en monocitos (Yoneno K 2013), y quisimos comprobar que la microglía también lo expresaba. Para ello determinamos la expresión del receptor mediante histoquímica en el cerebro murino (Figura 27 D) y por inmunocitoquímica en cultivos celulares, observando la expresión del receptor en la superficie celular (Figura 27 C), la expresión de la proteína receptora en lisados celulares (Figura 27 A), y del ARNm correspondiente en las diferentes condiciones de tratamiento (Figura 27 B).

Las células microgliales expresan basalmente el receptor TGR5 (Figura 27 A), y además, la expresión de su mensajero aumenta significativamente tras tratar las células con LPS ($p < 0,01$) o LPS y TUDCA ($p < 0,001$), con respecto a la situación control (Figura 27 B). El incremento producido por la adición de TUDCA a las células tratadas con LPS fue superior al producido en las células tratadas únicamente con la endotoxina ($p < 0,05$).

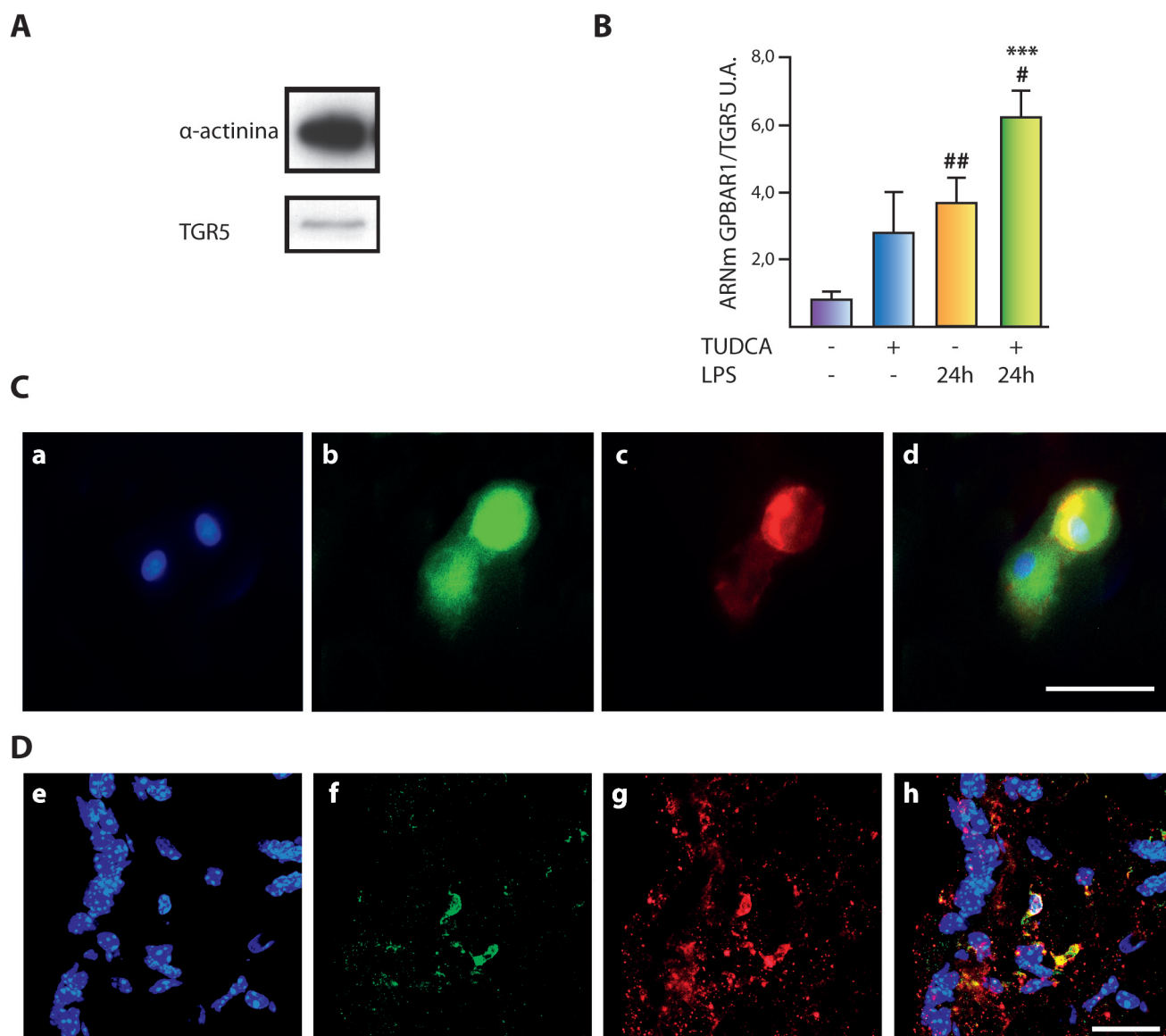


Figura 27. La microglía expresa GPBAR1/TGR5. La expresión de GPBAR1/TGR5 en células de microglía *in vitro* fue determinada mediante (A) western blot, (B) expresión del mensajero en las diferentes condiciones experimentales (media \pm EEM de al menos 4 ensayos independientes para cada grupo experimental), (C) mediante inmunocitoquímica (CD11b como marcador de microglía (b), TGR5 (c) y Hoechst 33342 como marcador nuclear (a)). Además, identificamos la expresión del receptor TGR5 en microglía de cerebro murino mediante inmunohistoquímica (Iba-1 marcador de microglía (f), TGR5 (g) y Hoechst 33342 como marcador nuclear (e)). Barras de calibración: 20 μ m.

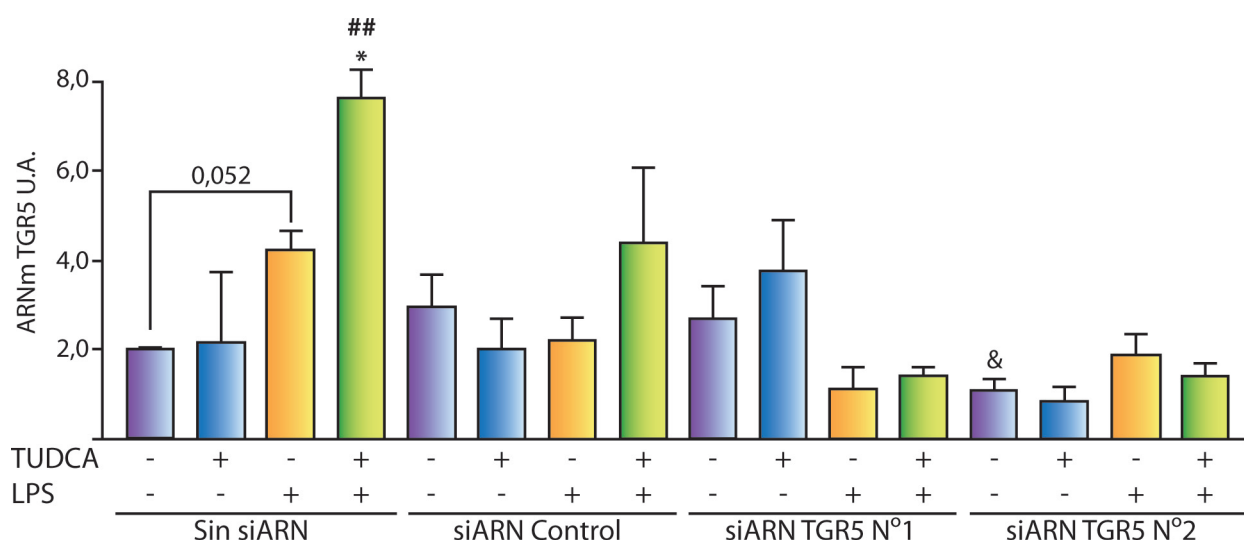


Figura 28. El siARN N°2 de GPBAR1/TGR5 reduce la expresión del ARNm para el receptor TGR5 en microglía. La expresión del ARNm para GPBAR1/TGR5 se determinó en 4 condiciones experimentales: en células sin transfectar, transfectándolas con un siARN control, y transfectándolas con los siARN comerciales 1 y 2 específicos para el receptor. Los resultados representan la media \pm EEM de al menos 4 ensayos independientes para cada grupo experimental. * $p < 0,05$ en comparación al tratamiento con LPS, ## $p < 0,01$ respecto del control dentro de cada tratamiento, & $p < 0,05$ respecto del tratamiento control transfectado con siARN control.

5.4. Efecto funcional de la reducción de TGR5 mediante siARNs comerciales

Para estudiar el efecto de la reducción del receptor GPBAR1/TGR5 en la respuesta celular, la microglía se transfectó con dos siARNs comerciales, específicos para el receptor de sales biliares, y un siARN control. El siARN comercial N°2 redujo la expresión del ARNm de TGR5 tanto en la microglía control como tras los diferentes tratamientos (Figura 28). Sin embargo, el siARN N°1, no produjo una reducción en la expresión basal del mensajero de TGR5 pero sí del incremento producido tras los tratamientos. El siARN control, por su parte, incrementaba levemente la expresión del mensajero en condiciones control, y desaparecía el incremento inducido por LPS, aunque el inducido por LPS y TUDCA se mantuvo.

Posteriormente estudiamos el efecto del receptor en la activación del reportero CRE-Luc inducida por TUDCA. La reducción del receptor supuso la reversión del efecto del TUDCA en la activación de CRE-Luc inducida tanto por LPS como por TUDCA (Figura 29 A). Estos resultados demostraron que el TUDCA activa el receptor GPBAR1/TGR5, aumentando la producción de AMPc mediante la activación de la adenilato ciclasa e induciendo el reportero CRE-Luc.

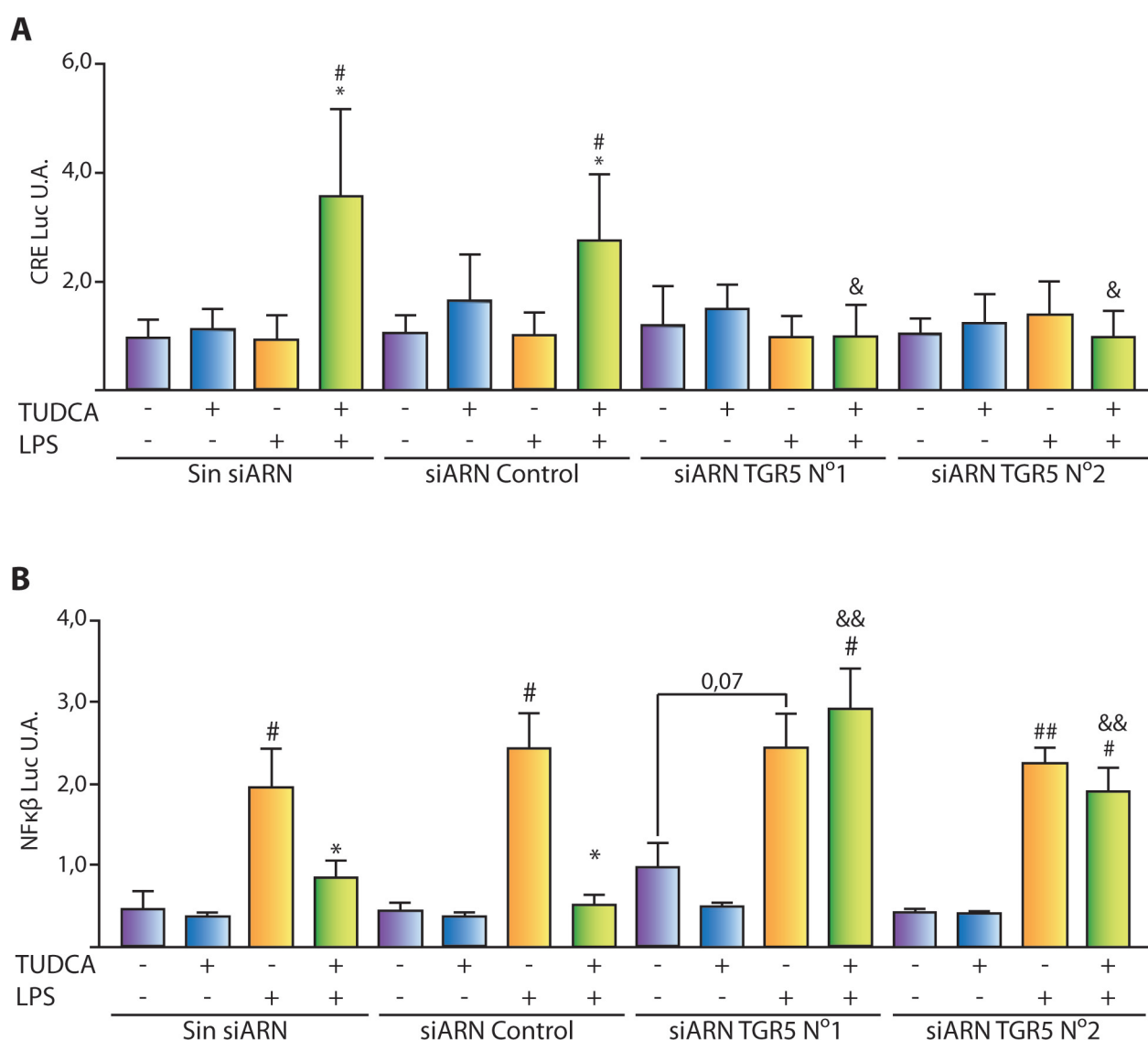


Figura 29. La activación de AMPc y la inhibición de la vía de NFκβ por TUDCA en microglía son dependientes de GPBAR1/TGR5. La dependencia de GPBAR1/TGR5 en la activación del reportero CRE-Luc y el de NFκβ (B) inducida por TUDCA fue determinada mediante el bloqueo del receptor con dos siARNs comerciales específicos. Los resultados muestran la media de la relación entre la expresión del plásmido reportero y el reportero de renilla SV40-pRL (control de la eficiencia de transfección) ± EEM en al menos 5 experimentos por cuadruplicado. * $p < 0,05$ en comparación con el tratamiento con LPS, # $p < 0,05$ en comparación con el control dentro de cada tratamiento, & $p < 0,05$ en comparación con el tratamiento LPS + TUDCA del siARN Control.

La reducción del receptor TGR5 también revirtió el efecto inhibitor del TUDCA en la activación del plásmido reportero de NFκB (Chowy cols. 1999) inducida por LPS en las células de microglía (Figura 29 B).

Por último, estudiamos la importancia del receptor TGR5 en la expresión del ARNm para las diferentes condiciones experimentales en microglía. Los resultados mostraron que el siARN N°2 revirtió la inhibición de la inducción de la *iNOS* producida en el tratamiento de LPS y TUDCA, mientras que el N°1 no (Figura 30). El aumento del mensajero de *IL-12 β* desapareció en todos los tratamientos, tras la transfección con ambos siARNs. Ambos siARNs alteraron por completo la expresión del mensajero para *DUSP-1*. La transfección del siARN control modificó el patrón de expresión de ARNm de *Arg1*, *CD200R1* y *MHCII* con respecto al observado en las células no transfectadas. La transfección con el siARN N°1 únicamente redujo la inducción de *IRAK-M* y *Sphk1* en las células tratadas con LPS y TUDCA. Sin embargo, esta reducción no fue estadísticamente significativa. La microglía transfectada con el siARN N°2 redujo el incremento en la expresión de ARNm para *Arg1*, *CD200R1*, *IRAK-M*, *PD-L1* y *Sphk1*, siendo esta reducción estadísticamente significativa, excepto en el caso de *Arg1* e *IRAK-M* (Figuras 31 a y 31 b). Curiosamente, la transfección con este siARN produjo un incremento en la expresión de los ARNm *C/EBP β* , *IL-4R α* y *Sphk1* en las células tratadas con LPS en comparación con las células transfectadas con el siARN control. No se apreciaron diferencias en el patrón de expresión de ARNm para *IL-4R α* en las células tratadas con LPS y TUDCA tras la transfección de ningún siARN.

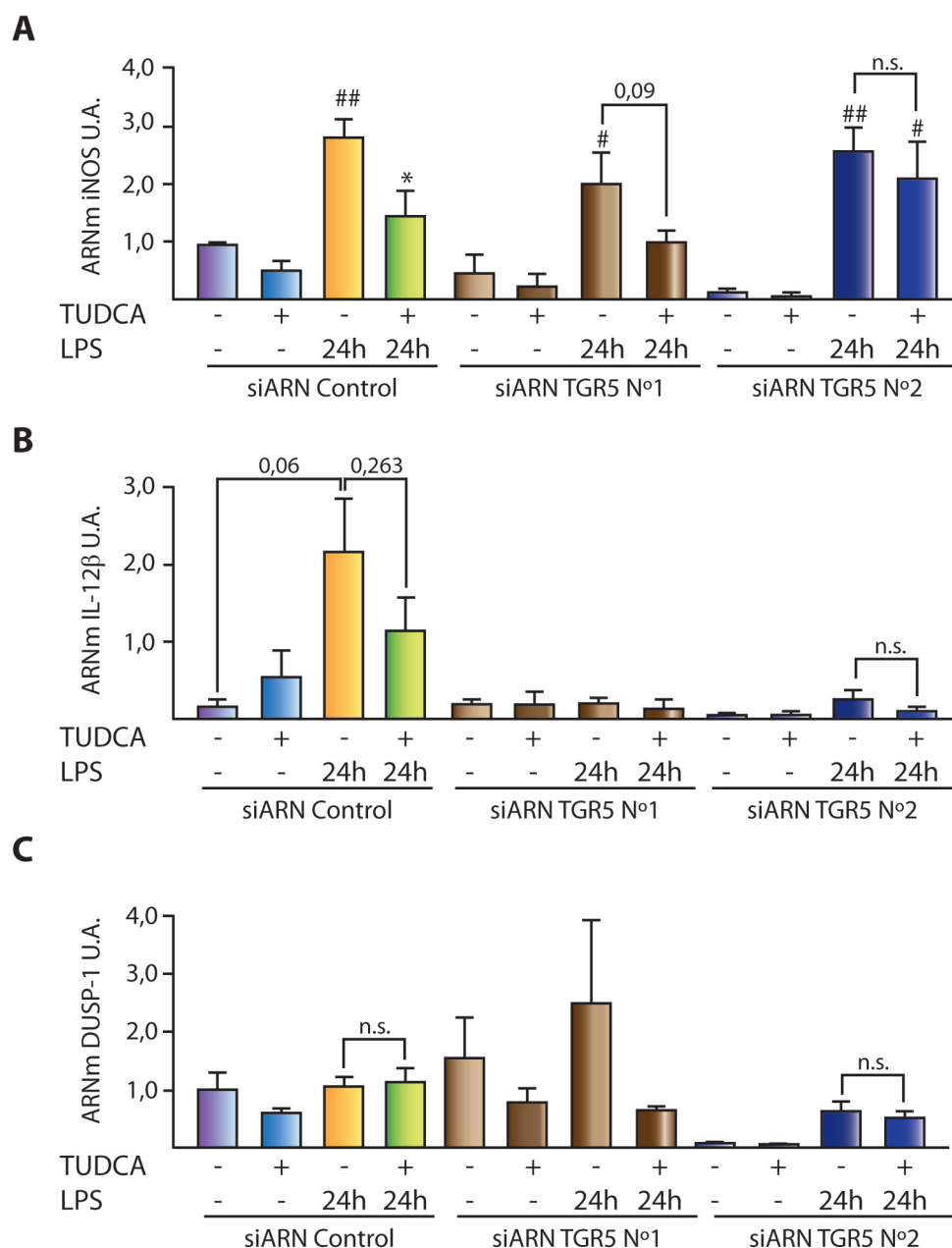
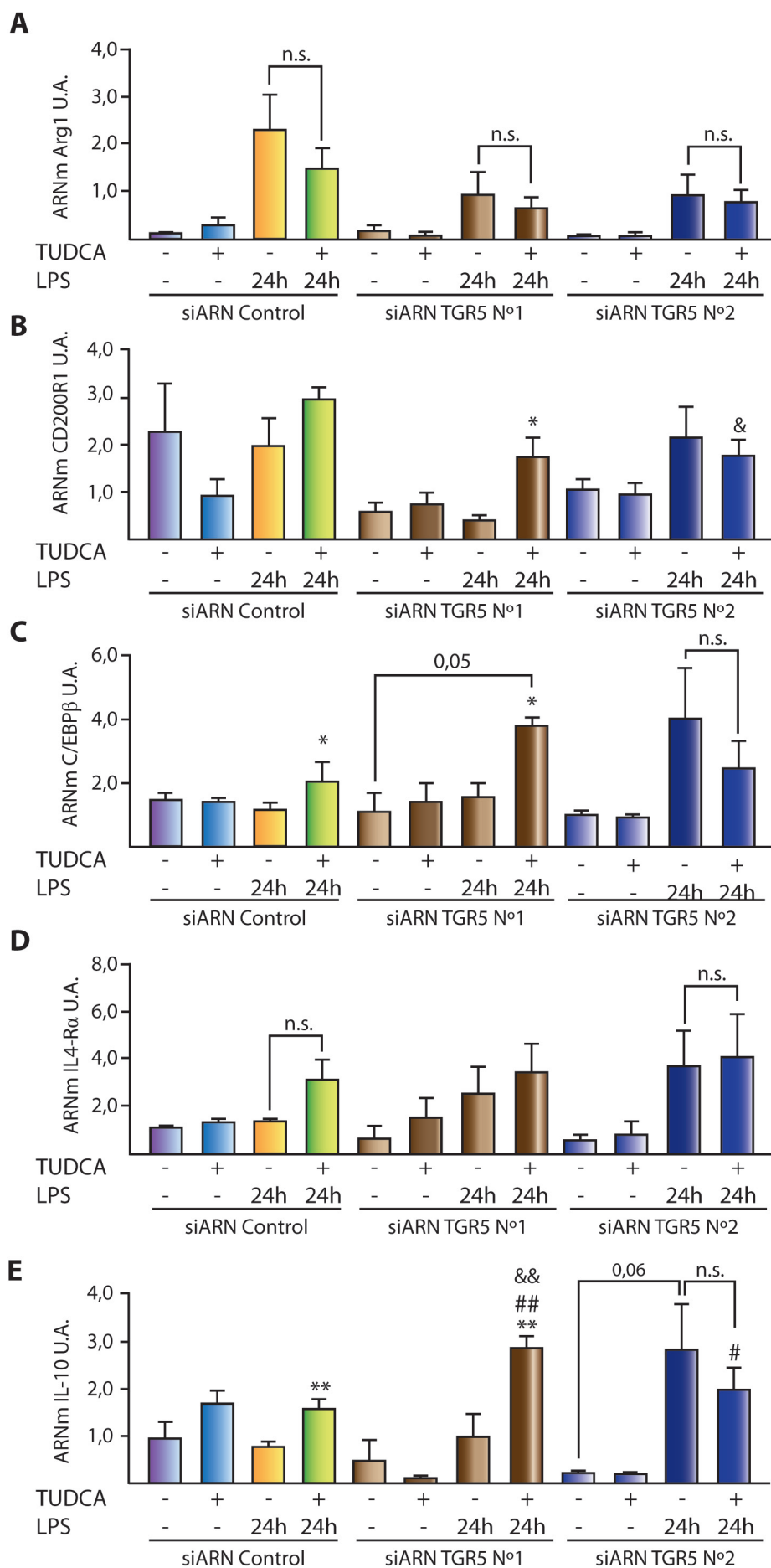


Figura 30. La reducción en la expresión del ARNm e *iNOS* por TUDCA en microglía depende de GPBAR1/TGR5. La dependencia de la expresión de marcadores de fenotipo M1 en microglía se estudió mediante el análisis de la expresión de ARNm en células microgliales transfectadas con un siARN control o con un siARN específico para el receptor GPBAR1/TGR5. Para ello, el efecto del silenciamiento del receptor GPBAR1/TGR5 en la expresión en microglía de ARNm para *iNOS*, *IL-12 β* y *DUSP-1* se determinó mediante PCR cuantitativa. Los resultados representan la media \pm EEM del ratio de la expresión de los genes con respecto al control endógeno 36B4, en al menos 4 experimentos independientes. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ con respecto al control; * $p < 0,05$ respecto del tratamiento con LPS.



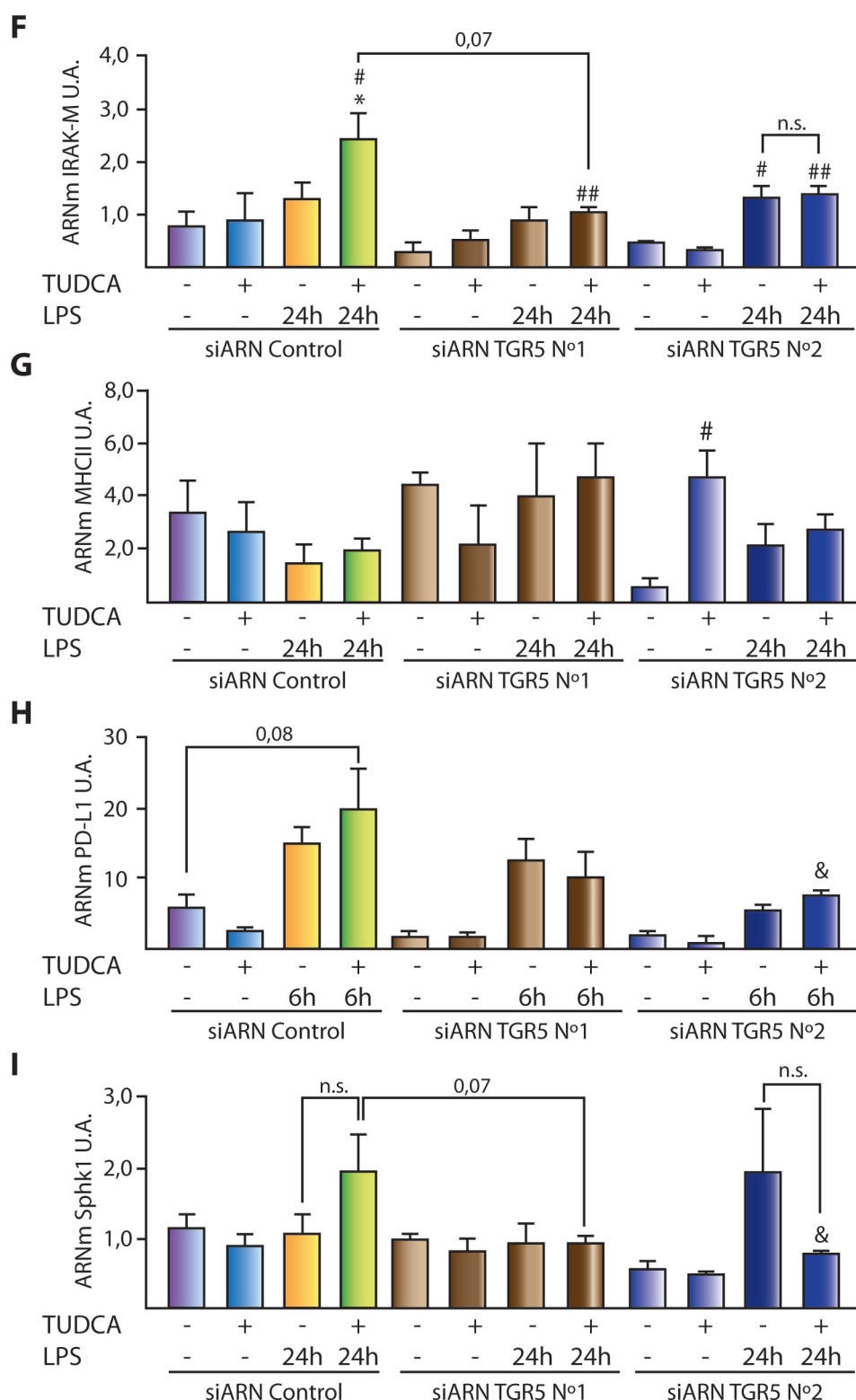


Figura 31. La expresión en microglía de algunos marcadores del fenotipo M2 es dependiente de GPBAR1/TGR5. Estudiamos el efecto del silenciamiento de GPBAR1/TGR5 en la expresión de marcadores de fenotipo M2 en microglía, mediante el análisis de la expresión de ARNm en células microgliales transfectadas con un siARN control o con un siARN específico del receptor GPBAR1/TGR5. Para ello, el efecto del silenciamiento del receptor GPBAR1/TGR5 en la expresión del ARNm para *Arg1*, *CD200R1*, *C/EBPβ*, *IL-4Rα*, *IL-10*, *IRAK-M*, *MHCII*, *PD-L1* y *Sphk1* se determinó mediante PCR cuantitativa. Los resultados muestran la media ± EEM de al menos 4 experimentos independientes. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ con respecto al control; * $p < 0,05$ con respecto al tratamiento con LPS; & $p < 0,05$, && $p < 0,01$ con respecto al mismo tratamiento en las células transfectadas con siARN Control.



DISCUSIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas y los traumatismos del SNC suelen ir acompañados de un fallo en la resolución de la inflamación. Esta respuesta inmune crónica y descontrolada puede derivar en una muerte celular masiva que conlleva déficits fisiológicos y funcionales. La microglía, como célula inmune residente del Sistema Nervioso, juega un papel fundamental en la cronificación o resolución del proceso neuroinflamatorio. Inicialmente, la microglía se activa y se polariza hacia un fenotipo M1, o proinflamatorio, en respuesta al daño o infección en el tejido nervioso, como primera línea de defensa. Posteriormente, el microambiente del parénquima nervioso puede inducir en la microglía un fenotipo M2, o antiinflamatorio, que facilite la vuelta a la homeostasis, favoreciendo así la regeneración en la zona afectada.

Por eso, la regulación del balance entre las células M1 y M2 en una situación patológica en función del momento, estadio y severidad del daño, resulta una diana terapéutica muy interesante para conseguir un tratamiento clínicamente efectivo.

Un requisito indispensable para el tratamiento farmacológico de la neuroinflamación es que el fármaco pueda atravesar la BHE y así, ejercer su efecto en el SNC. Las sales biliares atraviesan la BHE sin perder sus propiedades (Rodrigues CM 2002), y tienen un efecto neuroprotector. Sin embargo no todas las sales biliares y ligandos de TGR5 presentan el mismo efecto terapéutico en pacientes que en modelos animales. Ensayos clínicos recientes muestran que el tratamiento con un derivado del ácido oleanólico, con resultados prometedores en modelos animales, no mostró una mejora en los pacientes de ELA (Lenglet y cols. 2014). Sin embargo, estos pacientes toleraban bien el TUDCA, y esta sal biliar tenía un efecto beneficioso ya que realentizaba el desarrollo de la enfermedad (Elia y cols. 2015).

En el presente trabajo hemos tratado de evaluar el efecto de la sal biliar TUDCA en el proceso inflamatorio de las células gliales, prestando una atención especial a su efecto sobre las células de microglía.

El tratamiento con TUDCA reduce la activación glial tanto *in vivo* como *in vitro*, y limita la migración celular al parénquima afectado

La activación glial favorece el desarrollo de múltiples enfermedades neurodegenerativas (Frank-Cannon y cols. 2009, Skaper y cols. 2014). El retorno de estas células a un estado normal tras el proceso inflamatorio es un paso imprescindible para la recuperación y reparación del tejido afectado (Varin y Gordon 2009, Perry y Teeling 2013).

El estudio del efecto del TUDCA sobre las células gliales *in vitro* demuestra que la sal biliar tiene un efecto inhibitor de la inflamación inducida por LPS tanto en

astrocitos como en microglía, disminuyendo la producción de nitritos inducida por estímulos proinflamatorios, mediante la reducción de la transcripción y traducción de la enzima iNOS (Figura 7).

Estudios anteriores habían descrito que la inducción de la expresión de la iNOS está regulada por la ruta proinflamatoria de NFκB (Saura y cols.1998). También se había descrito que la activación de NFκB depende de la actividad PKR en algunas poblaciones de monocitos específicos de tejido (Cabanskiy cols. 2008). La actividad PKR puede estimular la actividad de NFκB interaccionando con el complejo IκB Quinasa, de una manera independiente de la actividad quinasa de la PKR y de la fosforilación de eIF2α inducida por la PKR (Bonnet y cols. 2000). Estudios previos (Joo y cols. 2004) mostraron que el tratamiento de la línea celular BV-2 con UDCA, un compuesto similar al TUDCA, reducía la producción de nitritos inducida por β-amiloide mediante la inhibición de la degradación de IκB, que bloqueaba la activación de NFκB.

Los resultados en esta tesis muestran que el pretratamiento con TUDCA inhibe la activación de la vía de NFκB por estímulos proinflamatorios, reduciendo su fosforilación y la activación del reportero (Figura 8). Este efecto se debe a una reducción de la fosforilación de la Ser51 del factor iniciador de la traducción eIF2α y no a que el TUDCA afecte a la fosforilación de la PKR en Thr451. Por lo tanto, la sal biliar realiza su efecto inhibidor en algún punto entre la fosforilación de la PKR y la de eIF2α. La atenuación de la traducción inducida por la fosforilación de eIF2α favorece la traducción de los genes diana de NFκB (Deng y cols. 2004), ya que inhibe la traducción de ARNm para el inhibidor de NFκB, IκB, lo que a la larga aumenta la proporción de proteína NFκB y la activación de la ruta proinflamatoria (Zhang y Kaufman 2008). Por lo tanto, el tratamiento con TUDCA al reducir la fosforilación de eIF2α podría aumentar la proteína IκB y reducir la activación de NFκB.

Por otra parte, observamos que el TUDCA reducía la reactividad de la microglía en un modelo animal de neuroinflamación aguda por inyección icv de LPS (Figura 9). Sin embargo, no se aprecia el mismo efecto en los astrocitos. Esto puede ser debido a que la activación astrocitaria en procesos inflamatorios es posterior a la de la microglía (Kreutzberg 1996), y los tiempos que hemos estudiado (1 día y 3 días) podrían ser muy tempranos para poder observar el efecto del TUDCA en los astrocitos.

La inyección de LPS indujo un aumento de las células Iba-1 positivas en el hipocampo de los ratones tratados, que se redujo en aquellos que además habían recibido inyecciones de TUDCA (Figura 10). Este resultado sugiere que, bien la capacidad migratoria o la capacidad proliferativa de la microglía, estarían alteradas. Los resultados mostraron que el tratamiento con TUDCA limita la capacidad

migratoria de la microglía, por un efecto directo sobre este tipo celular (reduce la migración ante un estímulo promigratorio como es el $\text{IFN}\gamma$) y reduce la secreción de MCP-1 por los astrocitos. Además, en los hipocampos de ratones tratados, inhibió la transcripción del ARNm de moléculas clave en la regulación de la migración de monocitos y microglía como MCP-1 o RANTES, que favorecen el reclutamiento de leucocitos (Figura 11). La delección o bloqueo de la síntesis de estas quimioquinas se traduce en una reducción en la entrada de leucocitos al SNC, reduciendo su activación en modelos neurodegenerativos (dos Santos y cols. 2005, Semple y cols. 2010). Por último, la inyección de LPS aumenta la expresión endotelial de VCAM-1, necesaria para la trans migración de monocitos sanguíneos al parénquima neural, y el tratamiento con TUDCA redujo su expresión a niveles basales (Figura 12).

El efecto del TUDCA, reduciendo la reactividad microglial, y la expresión de quimioquinas y de la molécula de adhesión VCAM-1, podría explicar la menor infiltración de células sanguíneas y monocitos al parénquima cerebral observado en los ratones de nuestro modelo de neuroinflamación tratados con TUDCA con respecto a los no tratados.

El tratamiento con TUDCA favorece un cambio del fenotipo de la microglía de proinflamatoria hacia antiinflamatoria

El fenotipo microglial proinflamatorio (M1) libera mediadores proinflamatorios que inducen la activación y reclutamiento de células al foco de la inflamación. Si la respuesta inflamatoria no restaura la homeostasis, la microglía M1 y los leucocitos pueden cronificar el proceso neuroinflamatorio (MacMicking y cols. 1997, Aloisi y cols. 2001, Lucas y cols. 2006). La polarización microglial hacia un fenotipo antiinflamatorio (M2) podría resultar beneficiosa en patologías del SNC por sus propiedades antiinflamatorias e inhibitorias de la muerte neuronal secundaria, además de su capacidad proregenerativa (Kigerl y cols. 2009).

En nuestro modelo de neuroinflamación, el tratamiento con TUDCA, además de reducir el número de células de microglía en el hipocampo de estos ratones a niveles basales, redujo significativamente la población de microglía M1 (células $\text{Iba-1}^+/\text{CD16}^+/\text{CD32}^+$) y aumentó la población de microglía M2 (células $\text{Iba-1}^+/\text{Arg1}^+$) en el hipocampo de los ratones inyectados icv con LPS (Figuras 13, 14 y 14b).

El análisis de la expresión de ARNm para marcadores de ambos fenotipos microgliales en el hipocampo, dio como resultado que el tratamiento con TUDCA en presencia de LPS redujo la expresión de algunos de los marcadores de fenotipo M1 (como $\text{IL-12}\beta$, $\text{MIP-1}\alpha$, o RANTES), pero no así los de $\text{IL-1}\beta$ o MCP-1 (Figura 15). De

manera similar, incrementó la expresión de marcadores M2 (como *Arg1*, *IL-4R α* , *IL-10*, *Sphk-1*; Figura 16), pero no observamos variación en el ARNm para *IL-4* o *IL-13*, dos moléculas implicadas en la activación alternativa de la microglía y su polarización hacia M2 (Gordon 2003).

El LPS icv causó un aumento en la expresión del ARNm para *MHCII*, que disminuyó tras la inyección con TUDCA. Esta molécula es crucial para desarrollar una respuesta inmune frente a patógenos y se encuentra en células presentadoras de antígeno, como las células dendríticas, endoteliales o células fagocíticas, que interaccionan con linfocitos T (Cresswell 1994, Nelson y Fremont 1999). Mediadores proinflamatorios, como el IFN γ , inducen la expresión de MHCII en estas células para favorecer una respuesta inmune más eficiente contra patógenos (Ting and Trowsdale 2002). La reducción en esa expresión producida por el tratamiento con TUDCA sugiere que el ambiente no es lo suficientemente proinflamatorio para inducir una respuesta antigénica.

El incremento en *Arg1* resultó ser muy similar en los ratones inyectados con LPS y en los que además fueron tratados con TUDCA. La inducción de la *Arg1* por ligandos de TLR (Toll-like receptors) a través de un mecanismo independiente de Stat6, ha sido descrita por otros grupos como una respuesta celular para controlar la producción de NO en infecciones crónicas (El Kasmi y cols. 2008). Por lo tanto, esta inducción del mensajero podría ser debida a un efecto del tratamiento con LPS.

La falta de correlación entre la tinción inmunohistoquímica y la expresión de ARNm para la *Arg1* en los hipocampos puede deberse a que la expresión de ARNm es a nivel global de hipocampo, donde existen otros tipos celulares, además de microglía, que pueden tener inducido el ARNm para esta enzima. Sin embargo, en la tinción histoquímica se observó un aumento en la expresión de *Arg1* y una reducción en la expresión de CD16/CD32 en las células de microglía, lo que indica una tendencia al cambio en las proporciones de los fenotipos microgliales en el tejido.

Para estudiar el posible cambio en el fenotipo de la microglía hacia el fenotipo M2, inducido por TUDCA, utilizamos cultivos de microglía, determinando, en primer lugar, si el TUDCA inducía la producción de AMPc intracelular, como había sido descrito con otras sales biliares (Kawamata Y 2003). Además, sabíamos que este segundo mensajero era responsable del efecto antiinflamatorio de factores de crecimiento y neuropéptidos (Kim y cols. 2000, Dello Russo y cols. 2004). Por ello, estudiamos el efecto de los niveles de AMPc, inducidos por los diferentes tratamientos, sobre la activación del reportero CRE-Luc.

Tanto el tratamiento únicamente con TUDCA como el tratamiento sólo con LPS, en cultivos de microglía, inducían un ligero aumento en la producción de AMPc con respecto al control tras 3 y 6 horas de tratamiento. En la microglía tratada con TUDCA y LPS, la producción de AMPc aumentó mucho más que ambos compuestos por separado, lo que sugiere una acción sinérgica de ambos (Figura 26).

El tratamiento de la microglía transfectada con el reportero CRE-Luc con TUDCA, indujo dos picos de activación del reportero, tras 2 y a las 3 horas de tratamiento, siendo el pico de 2 horas el de mayor amplitud. El tratamiento con LPS tuvo un menor efecto sobre la activación del reportero CRE-Luc, y la amplitud de los dos picos a las 2 y 6 horas fue muy inferior a la del tratamiento con TUDCA. La actividad del reportero CRE-Luc en la microglía tratada con TUDCA y LPS presentó los mismos picos de activación que el tratamiento de la microglía con TUDCA sólo. Sin embargo, la magnitud del pico de activación de CRE-Luc por TUDCA más LPS, a 6 horas, fue muy superior a la microglía tratada sólo con LPS. Estos resultados sugieren que hay un efecto sinérgico del TUDCA y el LPS en la activación de CRE-Luc tras 6 horas de tratamiento.

Comparando los resultados de la activación del reportero CRE-Luc en la microglía tratada sólo con TUDCA, con respecto a la tratada con TUDCA y LPS, observamos que la magnitud del pico a las 2 horas se redujo considerablemente y que el pico a las 3 horas del tratamiento con TUDCA únicamente, desapareció. En cambio, apareció un pico de máxima activación del reportero CRE-Luc a las 6 horas de tratamiento con TUDCA y LPS que no aparecía en la microglía tratada sólo con TUDCA.

Los resultados sugieren que el LPS provoca un retraso en la activación por TUDCA del reportero CRE-Luc. Probablemente, al pretratar las células con TUDCA se activaron los factores de transcripción que responden a los niveles de AMPc. Al añadir después el LPS, estos factores de transcripción ya estaban todos activados (fosforilados), y era necesaria su desfosforilación o la síntesis de nuevos factores de transcripción para poder responder al LPS y activar robustamente el reportero CRE-Luc. Bajo el punto de vista de la activación por LPS, se podría decir que el pretratamiento con TUDCA facilita una activación más robusta del reportero CRE-Luc en comparación al tratamiento con LPS sólo. Otra posible explicación es que en algunos tipos celulares el TGR5 se internalizó tras su unión a ligando, por lo que habría un desfase temporal en la disponibilidad del receptor para activar su cascada de señalización (Kawamata Y 2003).

El tratamiento con TUDCA indujo la activación génica de genes antiinflamatorios (IL-4) a la vez que redujo la de genes proinflamatorios (NFκB; Figura 17). El pretratamiento con un competidor del AMPc que inhibe la PKA revirtió la inhibición del reportero de

NF κ B–Luc inducida por TUDCA e incrementó la activación del reportero de la IL-4, lo que sugiere que ambos procesos están mediados por el AMPc.

En el caso de la expresión del ARNm en cultivos de microglía, el TUDCA redujo significativamente el incremento de *iNOS* y *DUSP-1* inducido por LPS, mientras que la reducción de *IL-12 β* no llegó a ser significativa (Figura 18). El pretratamiento con un inhibidor de la PKA (Rp-cAMPS) revirtió el efecto inhibitorio del TUDCA sólo en el caso de *DUSP-1*. Además, el pretratamiento con Rp-cAMPS también redujo la inducción de *DUSP-1* por LPS, ya que la inducción de *DUSP-1* está regulada por la activación de NF κ B y este requiere la activación de la PKA (Zhou y cols. 2003, Casals-Casas y cols. 2009). La producción de AMPc inducida por el tratamiento con TUDCA y la consecuente inhibición de NF κ B, generaron la inhibición de la expresión de *DUSP-1*, que desapareció al inhibir la producción de AMPc inducida por la PKA.

La reducción en el ARNm de la *iNOS* observada al añadir el Rp-cAMPS en el tratamiento con LPS, probablemente es debida a que el AMPc tiene un doble papel en la expresión de la *iNOS* en células gliales, porque puede reducir la producción de NO (reduciendo su transcripción) o incrementarla (estabilizando la proteína) en función del tipo celular (Won y cols. 2004).

Además, el TUDCA indujo la transcripción de *IRAK-M* (Figura 19 b), un inhibidor de la ruta de NF κ B (Kobayashi y cols. 2002), de una manera parcialmente dependiente de AMPc. Aparte de inhibir la actividad quinasa de IRAK-1 e IRAK-2 inducida por la estimulación del TLR4 por LPS, necesaria para la activación de NF κ B, JNK o p38RK, IRAK-M es un marcador de microglía M2, y su expresión es necesaria, al menos en parte, para la inducción del fenotipo M2 en monocitos de tumores (Standiford y cols. 2011). La combinación de la inhibición directa de la fosforilación de NF κ B mediada por la inhibición de la fosforilación de eIF2 α y la inducción de inhibidores de NF κ B, como IRAK-M, podría ser responsable del efecto inhibitorio del TUDCA en las rutas proinflamatorias.

La transcripción de *Arg-1*, *C/EBP β* , *IL-4R α* y *MHCII* inducida por TUDCA, fue inhibida, aunque de forma no significativa, por el inhibidor de la PKA Rp-cAMPS, por lo que su inducción es parcialmente dependiente de AMPc (Figura 19 a y b). La región básica de la cremallera de leucinas del factor de transcripción C/EBP β es necesaria para la inducción del fenotipo M2 en monocitos y además regula la expresión de Arg1 (Gray y cols. 2005, Ruffell y cols. 2009). Durante la activación de monocitos, se ha observado una inducción transcripcional de C/EBP β por el activador transcripcional CREB (Bradley y cols. 2003), que tiene dos sitios CRE en su promotor (Niehof y cols. 1997). El C/EBP β

juega un papel muy importante en la polarización de la microglía hacia el fenotipo M2, debido a su papel como inductor transcripcional de la *Arg1* (Gray y cols. 2005) y la *IL-4* (Berberich-Siebelt y cols. 2000). La transcripción de *Arg1* está inducida tanto por LPS (Ryan y cols. 1980), como por el AMPc (Jakway y cols. 1980). En nuestros experimentos *in vitro*, el LPS incrementó la transcripción de *Arg1*, y el tratamiento con TUDCA lo aumentó de manera similar. El TUDCA podría incrementar la transcripción de *Arg1* y del promotor de la *IL-4* induciendo el factor de transcripción *C/EBPβ* gracias al incremento en los niveles de AMPc.

Tanto el LPS como el AMPc regulan la expresión de la subunidad alfa del receptor de la *IL-4* (*IL-4Rα*), que se une con alta afinidad a la *IL-4* y es necesaria para su respuesta (de Wit y cols. 1994, Nelms y cols. 1999, Fenn y cols. 2012). El tratamiento con LPS indujo unas cuatro veces la transcripción de *IL-4Rα* en microglía, y se observó un efecto aditivo en la expresión del mensajero tras añadir TUDCA. En las células tratadas con Rp-cAMPS, la expresión del ARNm se revertía a los niveles de las células tratadas únicamente con LPS, lo que sugiere que la inducción producida por TUDCA depende del AMPc.

A diferencia de lo observado en los ARNm de tejido, el tratamiento con LPS y TUDCA *in vitro* incrementó la expresión del mensajero de *MHCII*. A pesar de que ha sido descrito que el AMPc tiene un efecto antiinflamatorio inhibiendo la producción de *IL-12* y *MHCII* y favoreciendo la expresión de *IL-10* (Kambayashi y cols. 2001, Nashar y Drake 2006), en nuestro caso observamos un incremento en la expresión del ARNm de *MHCII* e *IL-10* en el tratamiento con LPS y TUDCA.

El *MHCII* es un marcador tanto de microglía M1 proinflamatoria como de microglía M2 antiinflamatoria, por lo que el aumento en su expresión puede tener efectos antagónicos. El *MHCII* aumenta la actividad de NFκB a través de la presentación de antígeno en el fenotipo M1. Sin embargo, *MHCII* también puede favorecer la producción de AMPc mediante la activación de la PKC y favorecer un fenotipo M2 (Cambier y cols. 1987). La inhibición de la PKA redujo parcialmente el incremento en la expresión del ARNm de *MHCII*, lo que sugiere que parte del incremento observado es debido al AMPc.

En el caso de la *IL-10*, no observamos una reducción en la magnitud del ARNm al inhibir la PKA. Hay estudios que describen que agonistas de TGR5 (entre los que se incluye el TUDCA) además de activar las proteínas G_s alfa, también activan, en hepatocitos, proteínas G heterotriméricas del tipo G_i (Dent y cols. 2005, Studer y cols. 2012). Esta ruta sería responsable de la activación de las quinasas Akt y MAPK y sería

dependiente del aumento de la producción de esfingosina-1-fosfato por la *Sphk1* (Studer y cols. 2012), de la producción de radicales libres y de la activación del receptor de EGF (Dent y cols. 2005).

Por lo tanto, la inducción por TUDCA de *IL-10* y de otros mensajeros inducidos, podría estar regulada por estas rutas independientes de AMPc.

La estimulación del receptor TLR4 genera un incremento en la expresión de PD-L1. El tratamiento con TUDCA hace este incremento aún más pronunciado, lo que sugiere que, de nuevo, la endotoxina y la producción de AMPc están actuando sinérgicamente. El tratamiento con Rp-cAMPS revierte la parte de activación inducida por el tratamiento con TUDCA, devolviéndola a los niveles de tratamiento con LPS, por lo que el efecto del TUDCA depende directamente de la activación de la PKA.

Por último, la inducción observada en el ARNm para la *Sphk1* en la microglía tratada con LPS y TUDCA es totalmente dependiente de AMPc. Estos resultados concuerdan con estudios previos que habían descrito la activación de la *Sphk1* por AMPc (Pitson y cols. 2003).

A continuación, investigamos si el cambio observado en el fenotipo microglial tras el tratamiento con TUDCA se traducía en un efecto funcional en cocultivos de microglía pretratada con neuronas (Figura 21). La microglía activada con LPS indujo muerte neuronal únicamente en los experimentos en los que existía un contacto directo entre ambos tipos celulares. El pretratamiento de la microglía con TUDCA inhibió la muerte neuronal inducida por microglía activada por LPS. La microglía tratada con LPS y TUDCA incrementó la transcripción de *CD200R1* en comparación con la microglía tratada únicamente con LPS. Esta glicoproteína es un receptor transmembrana expresado principalmente en la microglía que interacciona con la proteína CD200 expresada por neuronas y astrocitos, reduciendo la actividad de la microglía en condiciones fisiológicas (Wang y cols. 2011). La alteración en la expresión de CD200 y CD200R1 se ha descrito en las enfermedades de Alzheimer (Walker y cols. 2009), Parkinson (Wang y cols. 2011) o esclerosis múltiple (Koning y cols. 2007). Además, la expresión de CD200R1 se induce específicamente en monocitos M2, siendo un marcador de este fenotipo (Koning y cols. 2010) y se ha descrito que la interacción entre CD200 y CD200R1 es, además, crucial para el efecto neuroprotector de ciertos fármacos (Hernangomez y cols. 2012, Hernangomez y cols. 2014). Por lo tanto, la expresión de *CD200R1* inducida por el tratamiento con LPS y TUDCA podría estar implicada en la inhibición de la muerte neuronal inducida por microglía activada.

No se apreciaron variaciones en la expresión del ARNm para dos moléculas inductoras de la activación alternativa clásica de la microglía *IL-4* e *IL-13* en las diferentes

condiciones experimentales *in vitro* e *in vivo* (Figura 20). Por lo tanto, estos resultados sugieren que el tratamiento con TUDCA no indujo una polarización de microglía a un fenotipo de activación alternativa o M2a.

El estudio de los marcadores en cultivo sugiere que el tratamiento con TUDCA en presencia del estímulo proinflamatorio LPS genera una mezcla de poblaciones de microglía compuesta principalmente por poblaciones M2b (\uparrow IL-10, \downarrow IL-12 β , \uparrow C/EBP β , \uparrow PD-L1, \uparrow MHCII) y M2c (\uparrow IL-10, \downarrow IL-12 β , \uparrow C/EBP β , \uparrow PD-L1, \uparrow IL4R α , \uparrow Sphk1) sin hacer que la microglía M1, inducida por el LPS, desaparezca por completo. El LPS es necesario para la inducción del fenotipo M2b por el TUDCA, ya que no hemos observado inducción de estos genes en las células tratadas únicamente con la sal biliar. La población M2b produce IL-10, lo que podría favorecer paracrinamente la diferenciación a M2c de otras células de microglía cercanas.

El estudio del ARNm para los marcadores de fenotipo microglial en el hipocampo de ratones tratados con LPS y TUDCA mostró un patrón de marcadores que concuerda con un fenotipo de microglía M2c (\uparrow IL-10, \downarrow IL-12 β , \uparrow Arg1, \uparrow IL4R α , \uparrow TGF β , \uparrow Sphk1).

Los resultados obtenidos tanto *in vitro* como *in vivo* muestran que el tratamiento con TUDCA y LPS favorece la diferenciación de la microglía hacia un fenotipo inmunosupresor, ya sea M2b o M2c. Esto podría ser beneficioso para controlar la respuesta proinflamatoria, evitando su cronificación.

Las diferencias observadas entre los tratamientos *in vivo* e *in vitro* radican, en primer lugar, en que los ensayos *in vitro* se realizaron con un único tipo celular: microglía purificada de ratas postnatales, mientras que en el tejido existe una respuesta en la que están involucrados múltiples tipos celulares adultos. Como hemos mencionado en la Introducción, existen otras células, como neuronas, astrocitos y células endoteliales, que expresan el receptor de sales biliares TGR5. La respuesta de estas células al tratamiento con TUDCA, podría influir en la respuesta de la microglía, generando las diferencias que observamos. Además, no podemos descartar que la respuesta observada en los cultivos de microglía hubiera sido diferente, si los experimentos se hubieran realizado con microglía adulta, en lugar de microglía postnatal.

A pesar de que el TUDCA, *per se*, indujo un incremento en la producción de AMPc *in vitro*, sólo observamos la inducción de fenotipo M2 en aquellas células que también habían sido estimuladas con LPS. Esto sugiere que, en nuestro modelo, es necesaria la activación de NF κ B para una posterior diferenciación de las células hacia un fenotipo antiinflamatorio M2b o M2c. Estudios recientes demuestran que el paso de fenotipo proinflamatorio a antiinflamatorio en la microglía está regulado por la activación de IRF7. Los niveles basales de TGF β ₁ existentes en el cerebro inhiben la

activación de este factor de transcripción, lo que favorece el fenotipo proinflamatorio en las células mieloides, que requieren activadores específicos de IRF7 (como el IFN β_1) para poder diferenciarse hacia un fenotipo M2 (Cohen y cols. 2014). Es posible que el tratamiento con TUDCA esté ejerciendo un efecto similar.

El TUDCA inhibe la respuesta inmune

A pesar de que el SNC se considera un sistema inmunoprivilegiado, existe una respuesta inmune efectora que responde a cualquier infección o alteración de la homeostasis. Sin embargo, un fallo en el control de la respuesta inmune en el SNC puede derivar en inmunopatologías crónicas. Por ello, en nuestro modelo de neuroinflamación, hemos estudiado el efecto del TUDCA sobre las poblaciones de linfocitos.

Los hipocampos de los ratones tratados, no mostraron diferencias en la expresión de ARNm para *CCL22*, *CD103* ni *CTLA-4* (un factor quimiotáctico, una molécula de adhesión al endotelio y un inhibidor de la activación linfocitos T, respectivamente). Sin embargo, el tratamiento con TUDCA tras la inyección de LPS indujo un incremento significativo del ARNm de *Foxp3*, un marcador característico de linfocitos Treg, tanto en comparación con el control, como con el tratado con LPS (Figura 22 A).

El análisis de las poblaciones de linfocitos circulantes en cerebro mostró un aumento del infiltrado de linfocitos CD4⁺ en el parénquima cerebral de los ratones inyectados con LPS, que desaparecía en los animales tratados con TUDCA (Figura 22 B). Al analizar la población de linfocitos Treg observamos que el incremento en el mensajero de *Foxp3* no se correlacionaba con un mayor infiltrado de estos linfocitos (Figura 22 C). Es más, los ratones inyectados con LPS presentaban un pequeño infiltrado de estos linfocitos, mientras que los tratados además con TUDCA no. Podemos concluir, por esto, que el TUDCA está limitando el acceso de linfocitos CD4⁺ al parénquima cerebral en una situación de neuroinflamación aguda localizada. Una posible explicación del incremento del mensajero de *Foxp3* en los hipocampos de ratones tratados con LPS y TUDCA, es que sea otro tipo celular, distinto de los linfocitos Treg, el que lo expresa, puesto que se han descrito en la literatura otras células que expresan este factor de transcripción, como linfocitos CD8⁺*Foxp3*⁺ (Le y cols. 2011). También se ha descrito la existencia de poblaciones de macrófagos *Foxp3*⁺, aunque estos resultados no han sido reproducidos por ningún otro laboratorio (Manrique y cols. 2011).

Recientemente se ha propuesto que los linfocitos T de memoria monitorizan constitutivamente el SNC, viajando por el líquido cefalorraquídeo dentro del espacio subaracnoideo. A pesar de que no existen vasos linfáticos en el SNC, hay canales

perivasculares que drenan el líquido intersticial y los antígenos del SNC al líquido cefalorraquídeo, que los acerca a los ganglios cervicales, donde se puede producir la presentación antigénica (Ransohoff y Engelhardt 2012).

El estudio de las poblaciones de linfocitos $CD4^+$ en los ganglios cervicales de estos ratones mostró que los ratones que habían recibido LPS tenían una menor cantidad de linfocitos $CD4^+$, posiblemente debida a que se están infiltrando en el cerebro, y no diferían de los ratones control en la cantidad de linfocitos Treg (Figura 22 D, E). Sin embargo, aquellos que se habían tratado también con TUDCA presentaban un leve, aunque significativo, aumento de linfocitos Treg en los ganglios cervicales respecto a ratones control. Esto puede ser debido a que el $TGF\beta$ liberado en el cerebro esté teniendo un efecto de llamada a los linfocitos Treg, pero que estos no son capaces de penetrar en el parénquima debido a que el tratamiento con TUDCA inhibe la expresión de las moléculas de adhesión necesarias para su trans migración. No obstante, nuestros resultados muestran que el número de linfocitos Treg es bastante reducido, y sería necesario caracterizar la respuesta linfocitaria en etapas posteriores de la neuroinflamación para determinar la repercusión biológica de este aumento.

El TUDCA activa la vía del $TGF\beta$

La familia de moléculas del $TGF\beta$ tiene un papel neuroprotector en el SNC, además de ser uno de los principales inhibidores de la activación de monocitos y contrarrestar los efectos de diversas citoquinas proinflamatorias (Kriegelstein y cols. 1995, Flanders y cols. 1998, Horbelt y cols. 2012). Por esto, decidimos estudiar la activación de la vía de $TGF\beta$ utilizando el ratón transgénico (SBE/Tk-Luc) que tenía un reportero de los factores de transcripción Smad2/3 acoplado a la enzima luciferasa (Lin y cols. 2005). De esta manera, la activación de la vía de $TGF\beta$ se podía estudiar *in vivo* mediante la detección de bioluminiscencia en los animales. A pesar de que la inyección de LPS inducía la actividad de la ruta de $TGF\beta$, posiblemente debido a la liberación del $TGF\beta_1$ atrapado en la matriz extracelular (Sly y cols. 2004, Seki y cols. 2007), el tratamiento con TUDCA no sólo incrementaba esta activación, sino que la mantenía en el tiempo (Figura 23 A). El estudio de los mensajeros de los isotipos de $TGF\beta$ en hipocampos de ratón 24 h tras la inyección de LPS mostró que el tratamiento con TUDCA incrementaba la expresión del ARNm de $TGF\beta_3$ y $TGF\beta_2$ en comparación con el tratamiento con LPS, aunque el incremento en este último caso no era significativo (Figura 23 B).

Tanto el promotor de $TGF\beta_2$ como el de $TGF\beta_3$ tienen sitios de unión a AMPc. En concreto, el de $TGF\beta_2$ tiene un sitio de unión CRE/ATF y el de $TGF\beta_3$ un sitio de unión de CREB1 (Kingsley-Kallesen y cols. 2001, Zhou y cols. 2012), por lo que el aumento en

la expresión del ARNm podría estar mediado por la inducción de AMPc por el TUDCA. El $TGF\beta_2$ producido por microglía está implicado en procesos de neuroprotección, y además se ha descrito que modula la eficacia sináptica y la plasticidad neural y favorece la fosforilación de CREB en neuronas, lo que a su vez favorece la neuroprotección y supervivencia neuronal (Fukushima y cols. 2007, Polazzi y cols. 2009). El $TGF\beta_3$ es una molécula muy interesante para los procesos neuroinflamatorios, ya que, además de su papel regulador de las poblaciones de linfocitos, está implicado en la reparación de lesiones, reduciendo la cicatriz gracias a su capacidad antifibrótica, y también inhibe la proliferación de células encefalomitogénicas en modelos de EAE (Hosokawa y cols. 2003, Matejuk y cols. 2004, Shah y Qiao 2008, Deng y cols. 2011).

Además del incremento en la expresión del ARNm de $TGF\beta_3$, la expresión de la proteína aumentó en diversas áreas cerebrales, marcando preferentemente microglía, células endoteliales y neuronas (Figura 24 y 25). Esta inducción de $TGF\beta_3$ es una respuesta endógena al TUDCA de las células residentes del parénquima cerebral en presencia de LPS, ya que en esas condiciones apenas hay infiltrado de células inmunes de la sangre (linfocitos $CD4^+$, Treg, ni monocitos sanguíneos).

Podemos concluir que el tratamiento con TUDCA tras la inyección de LPS induce un proceso antiinflamatorio *in vivo* mediado por $TGF\beta$ que induce además la expresión de isotipos de $TGF\beta$ que podrían favorecer la neuroprotección y la resolución de lesiones tisulares. Este efecto está mediado por varios tipos celulares y no se observa en cultivos de microglía (Figura 20 B). Como el $TGF\beta$ estimula la expresión y la actividad arginasa en monocitos (Boutard y cols. 1995), es posible que las diferencias observadas entre los resultados *in vivo* e *in vitro* en la expresión de la Arg1 sean debidas a que *in vivo* hay una inducción de los mensajeros para $TGF\beta$, mientras que no lo hay en los cultivos de microglía *in vitro*. Además, la inducción de los ARNm de los isotipos de $TGF\beta$ estaría favorecida por la liberación de $TGF\beta$ de la matriz extracelular producido por la inyección de LPS. Esa activación de Smad2/3 más prolongada en el tiempo en los animales tratados con LPS más TUDCA sería necesaria para inducir la expresión de $TGF\beta_3$, ya que su promotor contiene un sitio de unión para CREB1 que requiere la activación de Smad3 (Liu y cols. 2006). Por esto, tanto la liberación de $TGF\beta$ por el LPS como el aumento de AMPc inducido por TGR5 serían necesarios para inducir la expresión de $TGF\beta_3$. Ambas condiciones no se producen ni en los animales tratados sólo con TUDCA, ni en los animales tratados sólo con LPS, y tampoco en los experimentos de microglía en cultivo.

El incremento de $TGF\beta_3$ en diferentes regiones cerebrales podría actuar como mecanismo de llamada a los linfocitos Treg que se observan en los ganglios cervicales.

Sin embargo, los linfocitos Treg se verían recluidos en los ganglios debido a la imposibilidad de penetrar en el tejido nervioso por la falta de quimioquinas como MCP-1 o RANTES y de proteínas de matriz extracelular, como VCAM-1, necesarias para su trans migración.

El tratamiento con TUDCA podría resultar en una mejor resolución del proceso inflamatorio gracias a la combinación de los siguientes mecanismos:

- a) Una mayor activación de la vía de $TGF\beta$, con la consiguiente reducción de la activación de las células gliales.
- b) La inducción de un fenotipo inmunosupresor en la microglía.
- c) La limitación de la entrada de células inmunes sanguíneas al parénquima nervioso afectado.

El efecto del TUDCA está determinado por su unión al receptor TGR5

Recientemente ha sido descrito un agonista del receptor GPBAR1/TGR5, BIX02694, con un efecto antiinflamatorio *in vitro* muy similar al TUDCA. Además, observaron una reducción en la activación de monocitos y microglía y un menor infiltrado de monocitos sanguíneos y linfocitos T al SNC, que en su caso correlaciona con una mejora en la evaluación clínica en un modelo animal de EAE (Lewis y cols. 2014). El efecto observado con BIX02694 era dependiente del AMPc, como ocurre con el TUDCA.

El receptor de sales biliares GPBAR1/TGR5 había sido descrito previamente en monocitos sanguíneos (Kawamata Y 2003) y algunas poblaciones de macrófagos residentes, como las células de Kupffer en el hígado (Keitel y cols. 2008) o los monocitos alveolares en los pulmones (Kawamata Y 2003). Sin embargo, no existían referencias en la bibliografía de la expresión de este receptor en microglía. Por ello estudiamos la expresión del receptor a nivel de ARNm, proteína y expresión en membrana de células de microglía en cultivo y en tejido (Figura 27). Tanto la microglía en cultivo como la microglía en el tejido cerebral de ratones control expresan el GPBAR1/TGR5. Además, la expresión del ARNm para GPBAR1/TGR5 aumentó tras el tratamiento de la microglía en cultivo con TUDCA, LPS o LPS y TUDCA, siendo el efecto sinérgico entre ambos estímulos.

La reducción en la expresión de GPBAR1/TGR5 mediante siARNs redujo la activación del reportero CRE-Luc inducida por LPS y TUDCA. Asimismo, abolió el efecto del TUDCA en la reducción de la activación del reportero de $NF\kappa B$ y el incremento

del reportero de IL-4 (Figura 29). Esto sugiere que el incremento en la producción de AMPc, la inhibición de la activación de NFκB y la activación de la vía de IL-4 que se producen tras el tratamiento con TUDCA, dependen de la unión de la sal biliar a este receptor.

La reducción en la expresión del receptor mediante siARN produjo un resultado inesperado. La transfección con los diferentes siARN incrementó la expresión basal de todos los ARNm, a excepción del ARNm de *IL-12β* (Figura 30 B). Estudios previos en ratones KO de TGR5 han descrito un incremento basal en la expresión génica de citoquinas inflamatorias y una respuesta más exacerbada ante un estímulo proinflamatorio en diferentes macrófagos tisulares (Wang y cols. 2011). Estos resultados sugieren que la expresión basal de TGR5 tiene un efecto represor o de freno sobre la actividad inflamatoria basal de la microglía.

A pesar de este aumento en la expresión basal, el siARN control no modificó el patrón de acción del TUDCA en la expresión de los mensajeros para *iNOS*, *IL-12β*, *C/EBPβ*, *IL-4Rα*, *IL-10*, *IRAK-M* y *Sphk1*. Sin embargo, sí lo hizo para la expresión de *DUSP-1*, *Arg1*, *CD200R1* y *MHCII* con respecto a la microglía sin transfectar (Figuras 30 y 31). Estos resultados sugieren que tanto el proceso de transfección de la microglía, como la expresión del siARN control podrían afectar a la expresión de estos ARNm.

La transfección de la microglía con el siARN N°2 de TGR5 (que disminuía el ARNm para TGR5 en todos los tratamientos), revirtió el efecto del TUDCA en los casos de *iNOS*, *IL-12β*, *IRAK-M* y *PD-L1*. La transfección con el siARN N°1 (que inhibía la inducción del ARNm de TGR5 por LPS y su combinación con TUDCA pero no en las células control) redujo la expresión de *IL-12β* e *IRAK-M*, pero no la de *iNOS* e *IL-10*. Esta diferencia en los resultados con los siARN N°1 y N°2 puede deberse al diferente nivel de inhibición del ARN para TGR5 por los siARNs.

El siARN N°2 indujo un cambio en el patrón de expresión de *C/EBPβ*, *IL-4Rα* e *IL-10*, con respecto a la microglía sin transfectar (Figura 31), debido a que el tratamiento con LPS inducía la expresión de estos ARN, por encima del siARN control. Los promotores de estos tres genes se inducen por LPS y presentan un sitio de unión a NFκB (Xia y cols. 1997, Cao y cols. 2006, Schedel y cols. 2009).

Como ha sido descrito en macrófagos procedentes de ratones KO para TGR5 (Wang y cols. 2011), el aumento transcripcional de estos genes observado en la microglía transfectada con el siARN N°2 de TGR5 tras el tratamiento con LPS podría ser debido a una activación basal de la ruta de NFκB producida por el silenciamiento de TGR5.

En el caso de *Sphk1*, además de un incremento en la expresión de su ARNm en las células transfectadas con el siARN control y tratadas con LPS, se observó una reversión de la inducción provocada por el tratamiento con TUDCA en la microglía transfectada con los siARNs para TGR5. Estos resultados están en sintonía con los resultados obtenidos con el inhibidor de la PKA (Rp-cAMPS). En el caso de *Sphk1*, la inducción de su transcripción por TUDCA depende tanto de la activación de TGR5 como de los niveles de AMPc.

Todos estos resultados indican que la expresión del receptor TGR5 es necesaria para el cambio de fenotipo microglial desde proinflamatorio, M1, hacia antiinflamatorio, M2, inducido por TUDCA tras un estímulo proinflamatorio. El silenciamiento de TGR5, no sólo hace desaparecer este efecto, sino que además provoca un aumento de la activación microglial basal y de su respuesta ante el estímulo proinflamatorio.

Como hemos mostrado en el desarrollo de este trabajo, los efectos beneficiosos del TUDCA se deben a un efecto neto antiinflamatorio e inductor de un fenotipo microglial inmunosupresor. Por esto, los agonistas de TGR5 podrían tener efectos beneficiosos en otros procesos asociados a la neuroinflamación. Además, los agonistas de TGR5 (como el TUDCA), podrían tener efectos beneficiosos en otros procesos patológicos asociados al proceso neuroinflamatorio, como la supervivencia neuronal en procesos de muerte neuronal secundaria por un doble mecanismo: incrementando la expresión de CD200R1 en la microglía y mediante una acción directa sobre las neuronas mediada por el incremento intracelular de AMPc. Este aumento además podría favorecer el crecimiento neurítico y por ende la regeneración axonal.

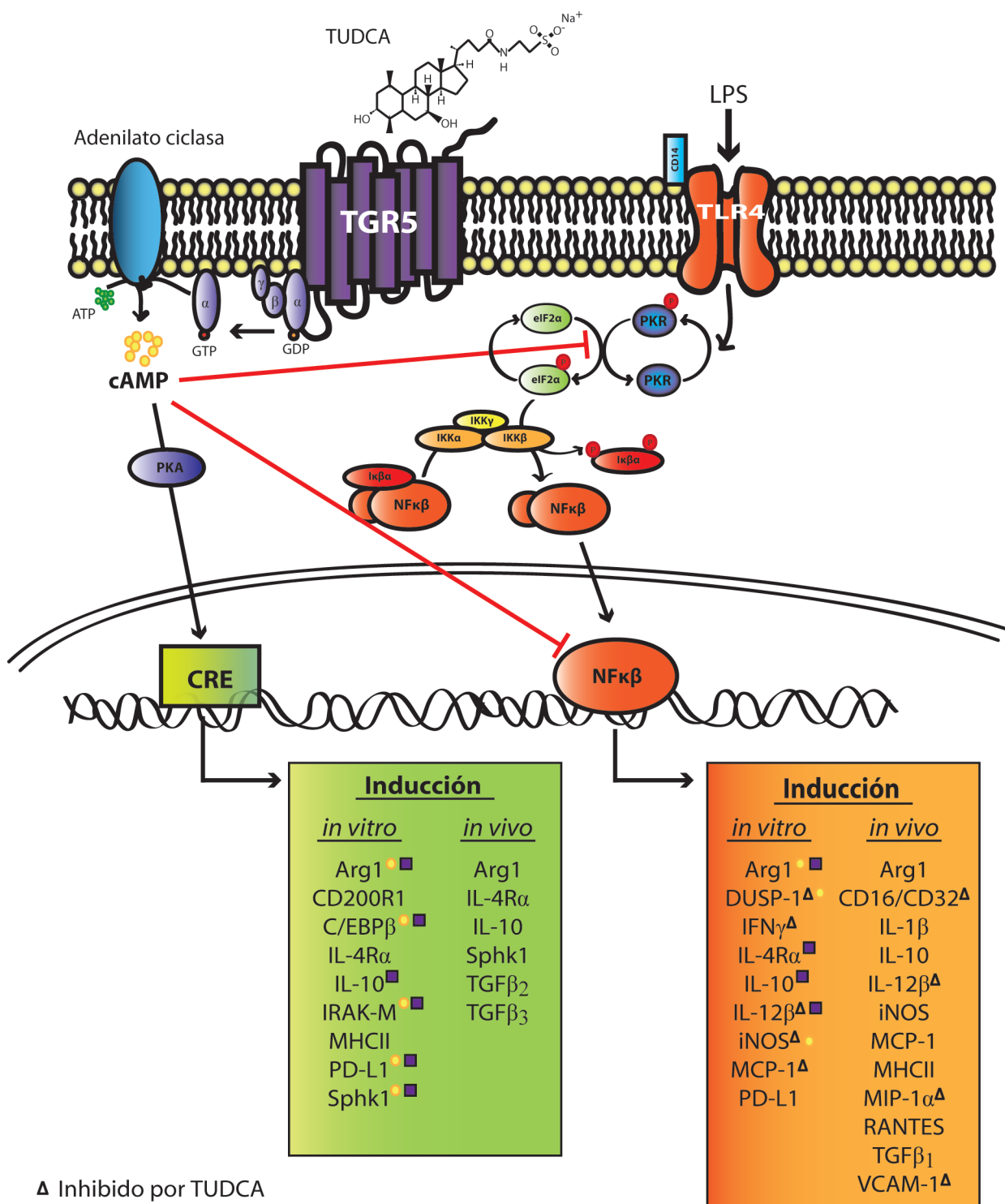
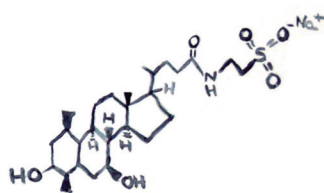


Figura 32. Esquema explicativo del efecto del TUDCA sobre el metabolismo celular. La unión de la endotoxina LPS al receptor TLR4 activa varias cascadas de transducción de señales que finalmente derivan en la translocación de NF κ B al núcleo celular y la transcripción y traducción de genes proinflamatorios. La unión del TUDCA al receptor de membrana GPBAR1/TGR5 desencadena la producción de AMPc que inhibe la fosforilación del factor de transcripción eIF2 α y la activación de NF κ B inducidas por la cascada de LPS, inhibiendo la expresión de algunos genes proinflamatorios. Además, activa la transcripción génica de genes antiinflamatorios en un proceso mediado por la unión a CRE. Δ Moléculas cuya inducción está inhibida tras el tratamiento con TUDCA. ● Genes regulados por AMPc. ■ Genes regulados por la expresión del receptor TGR5.

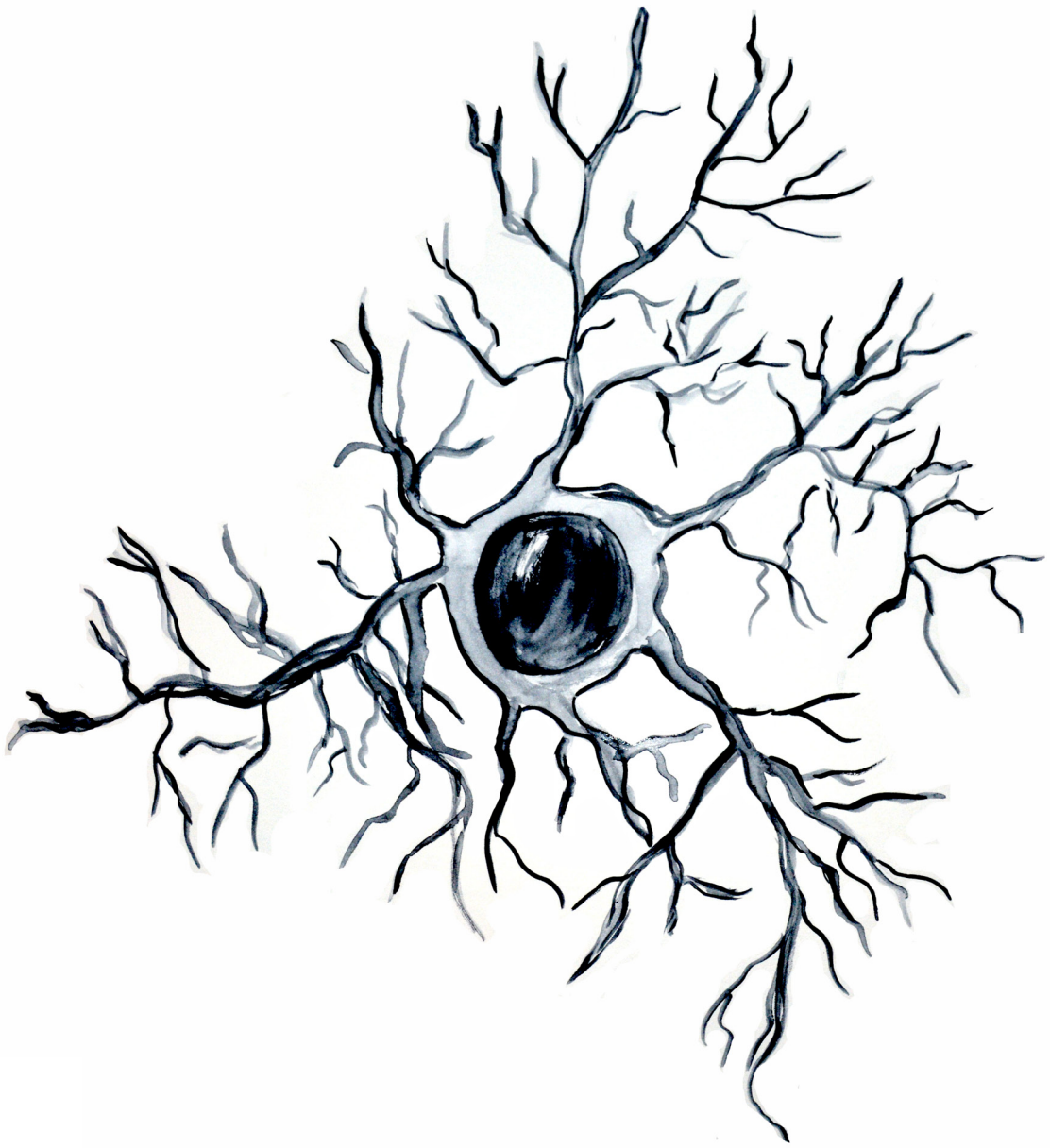


CONCLUSIONES

- 1- La sal biliar TUDCA reduce la neuroinflamación aguda ejerciendo un efecto directo sobre las células gliales reduciendo la activación de astrocitos y microglía, al inhibir la vía de NFκB.
- 2- El tratamiento con TUDCA en condiciones proinflamatorias limita la capacidad migratoria propia de la microglía e inhibe, además, la expresión de quimioquinas y proteínas de adhesión vascular en el endotelio, limitando la entrada de células inmunes sanguíneas al parénquima cerebral.
- 3- El tratamiento con TUDCA polariza las células de microglía hacia un fenotipo antiinflamatorio M2 tanto en un modelo de neuroinflamación aguda como en cultivo celular, incrementando la expresión de marcadores antiinflamatorios y reduciendo la expresión de marcadores proinflamatorios.
- 4- La adición de TUDCA en condiciones proinflamatorias *in vitro* inhibe la muerte neuronal inducida por la microglía activada.
- 5- El efecto antiinflamatorio y la polarización hacia un fenotipo M2 están determinados por la unión del TUDCA al receptor de membrana TGR5, y esta respuesta está mediada por AMPc.
- 6- El TUDCA aumenta la activación de la ruta de TGFβ *in vivo* en condiciones proinflamatorias, induciendo la expresión de TGFβ₂, y también de TGFβ₃ en microglía, células endoteliales y neuronas.
- 7- Por todo esto, y porque el TUDCA atraviesa libremente la BHE, podría ser una terapia beneficiosa para patologías que cursan con neuroinflamación, ya que tiene un efecto directo sobre las células gliales a través de la reducción de la reactividad glial, y la inhibición de la ruta proinflamatoria de NFκB. Además, el TUDCA reduce la infiltración de monocitos y linfocitos sanguíneos al parénquima afectado, al reducir la liberación de mediadores proinflamatorios por las células gliales, así como la expresión de moléculas de adhesión vascular y aumentando la activación de la ruta antiinflamatoria del TGFβ.

CONCLUSIONS

- 1- The biliary salt TUDCA reduces acute neuroinflammation through a direct effect on glial cells. It reduced astrocyte and microglial activation, by inhibiting the NF κ B pathway.
- 2- TUDCA treatment under proinflammatory conditions reduced microglial migratory capacity. Furthermore, it inhibited the expression of chemokines and vascular adhesion proteins in the endothelium, limiting the entry of immune blood cells into the brain parenchyma.
- 3- TUDCA treatment skewed microglial cell population towards an anti-inflammatory M2 phenotype in both an acute neuroinflammatory model and in cell culture, by causing an increase in the expression of anti-inflammatory molecules and a decrease in those proinflammatory.
- 4- TUDCA addition *in vitro*, under proinflammatory conditions, inhibits neuronal death induced by microglial activation.
- 5- Both, the anti-inflammatory effect and the polarization towards M2 phenotype, are mediated by TUDCA binding to the membrane receptor TGR5, and the consequent increase in cAMP.
- 6- TUDCA treatment under proinflammatory conditions *in vivo*, caused an increase in TGF β pathway activation, by inducing TGF β_2 expression, as well as by increasing TGF β_3 expression in microglia, endothelial cells and neurons.
- 7- Therefore, TUDCA could be a good therapeutic tool for pathologies that course with neuroinflammation, because it crossed the BBB and exerted a direct effect on glial cells through a decrease in glial reactivity and the inhibition of the proinflammatory NF κ B pathway. Besides, TUDCA reduced the infiltration of blood monocytes and lymphocytes into the injured parenchyma. It did so by decreasing glial cell release of proinflammatory mediators, reducing the expression of vascular adhesion molecules and increasing the activation of the anti-inflammatory TGF β pathway.



REFERENCIAS

- Ajami, B., J. L. Bennett, C. Krieger, W. Tetzlaff and F. M. Rossi (2007). "Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life." Nat Neurosci **10**(12): 1538-1543.
- Aloisi, F. (2001). "Immune function of microglia." Glia **36**(2): 165-179.
- Aloisi, F., E. Ambrosini, S. Columba-Cabezas, R. Magliozzi and B. Serafini (2001). "Intracerebral regulation of immune responses." Ann Med **33**(8): 510-515.
- Anders, H. J. and M. Ryu (2011). "Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis." Kidney Int **80**(9): 915-925.
- Bagasra, O., F. H. Michaels, Y. M. Zheng, L. E. Bobroski, S. V. Spitsin, Z. F. Fu, R. Tawadros and H. Koprowski (1995). "Activation of the inducible form of nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(26): 12041-12045.
- Balzar, S., H. W. Chu, P. Silkoff, M. Cundall, J. B. Trudeau, M. Strand and S. Wenzel (2005). "Increased TGF-beta2 in severe asthma with eosinophilia." J Allergy Clin Immunol **115**(1): 110-117.
- Bansal, V. and J. B. Ochoa (2003). "Arginine availability, arginase, and the immune response." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **6**(2): 223-228.
- Baptissart, M., A. Vega, E. Martinot, S. Baron, J. M. Lobaccaro and D. H. Volle (2013). "Farnesoid X receptor alpha: a molecular link between bile acids and steroid signaling?" Cell Mol Life Sci **70**(23): 4511-4526.
- Bauer J, R. H., Lassmann H (2001). "Inflammation in the nervous system: the human perspective." Glia **36**: 9.
- Benakis, C., L. Garcia-Bonilla, C. Iadecola and J. Anrather (2014). "The role of microglia and myeloid immune cells in acute cerebral ischemia." Front Cell Neurosci **8**: 461.
- Berberich-Siebelt, F., S. Klein-Hessling, N. Hepping, B. Santner-Nanan, D. Lindemann, A. Schimpl, I. Berberich and E. Serfling (2000). "C/EBPbeta enhances IL-4 but impairs IL-2 and IFN-gamma induction in T cells." Eur J Immunol **30**(9): 2576-2585.
- Bhatt, D. H., S. J. Otto, B. Depoister and J. R. Fetcho (2004). "Cyclic AMP-induced repair of zebrafish spinal circuits." Science **305**(5681): 254-258.
- Biber, K., T. Owens and E. Boddeke (2014). "What is microglia neurotoxicity (Not)?" Glia **62**(6): 841-854.
- Bierie, B. and H. L. Moses (2006). "Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer." Nat Rev Cancer **6**(7): 506-520.

- Biswas, S. K. and A. Mantovani (2010). "Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm." *Nat Immunol* **11**(10): 889-896.
- Block, M. L., L. Zecca and J. S. Hong (2007). "Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms." *Nat Rev Neurosci* **8**(1): 57-69.
- Boche, D., C. Cunningham, F. Docagne, H. Scott and V. H. Perry (2006). "TGFbeta1 regulates the inflammatory response during chronic neurodegeneration." *Neurobiol Dis* **22**(3): 638-650.
- Boche, D., V. H. Perry and J. A. Nicoll (2013). "Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain." *Neuropathol Appl Neurobiol* **39**(1): 3-18.
- Bonetti, B., C. Stegagno, B. Cannella, N. Rizzuto, G. Moretto and C. S. Raine (1999). "Activation of NF-kappaB and c-jun transcription factors in multiple sclerosis lesions. Implications for oligodendrocyte pathology." *Am J Pathol* **155**(5): 1433-1438.
- Bonnet, M. C., R. Weil, E. Dam, A. G. Hovanessian and E. F. Meurs (2000). "PKR stimulates NF-kappaB irrespective of its kinase function by interacting with the IkappaB kinase complex." *Mol Cell Biol* **20**(13): 4532-4542.
- Bottner, M., K. Kriegstein and K. Unsicker (2000). "The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions." *J Neurochem* **75**(6): 2227-2240.
- Bouhrel, M. A., B. Staels and G. Chinetti-Gbaguidi (2008). "Peroxisome proliferator-activated receptors--from active regulators of macrophage biology to pharmacological targets in the treatment of cardiovascular disease." *J Intern Med* **263**(1): 28-42.
- Boutard, V., R. Havouis, B. Fouqueray, C. Philippe, J. P. Moulinoux and L. Baud (1995). "Transforming growth factor-beta stimulates arginase activity in macrophages. Implications for the regulation of macrophage cytotoxicity." *J Immunol* **155**(4): 2077-2084.
- Bradley, M. N., L. Zhou and S. T. Smale (2003). "C/EBPbeta regulation in lipopolysaccharide-stimulated macrophages." *Mol Cell Biol* **23**(14): 4841-4858.
- Buckwalter, M. S. and T. Wyss-Coray (2004). "Modelling neuroinflammatory phenotypes in vivo." *J Neuroinflammation* **1**(1): 10.
- Butovsky, O., M. P. Jedrychowski, C. S. Moore, R. Cialic, A. J. Lanser, G. Gabriely, T. Koeglsperger, B. Dake, P. M. Wu, C. E. Doykan, Z. Fanek, L. Liu, Z. Chen, J. D. Rothstein, R. M. Ransohoff, S. P. Gygi, J. P. Antel and H. L. Weiner (2014). "Identification of a unique TGF-beta-dependent molecular and functional signature in microglia." *Nat Neurosci* **17**(1): 131-143.

- Cabanski, M., M. Steinmuller, L. M. Marsh, E. Surdziel, W. Seeger and J. Lohmeyer (2008). "PKR regulates TLR2/TLR4-dependent signaling in murine alveolar macrophages." Am J Respir Cell Mol Biol **38**(1): 26-31.
- Cambier, J. C., M. K. Newell, L. B. Justement, J. C. McGuire, K. L. Leach and Z. Z. Chen (1987). "The binding ligands and cAMP stimulate nuclear translocation of PKC in B lymphocytes." Nature **327**(6123): 629-632.
- Cao, S., X. Zhang, J. P. Edwards and D. M. Mosser (2006). "NF-kappaB1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages." J Biol Chem **281**(36): 26041-26050.
- Carrigan, S. O., D. B. Pink and A. W. Stadnyk (2007). "Neutrophil transepithelial migration in response to the chemoattractant fMLP but not C5a is phospholipase D-dependent and related to the use of CD11b/CD18." J Leukoc Biol **82**(6): 1575-1584.
- Casals-Casas, C., E. Alvarez, M. Serra, C. de la Torre, C. Farrera, E. Sanchez-Tillo, C. Caelles, J. Lloberas and A. Celada (2009). "CREB and AP-1 activation regulates MKP-1 induction by LPS or M-CSF and their kinetics correlate with macrophage activation versus proliferation." Eur J Immunol **39**(7): 1902-1913.
- Cipriani, S., A. Mencarelli, M. G. Chini, E. Distrutti, B. Renga, G. Bifulco, F. Baldelli, A. Donini and S. Fiorucci (2011). "The bile acid receptor GPBAR-1 (TGR5) modulates integrity of intestinal barrier and immune response to experimental colitis." PLoS One **6**(10): e25637.
- Cobbold, S. P., E. Adams, L. Graca, S. Daley, S. Yates, A. Paterson, N. J. Robertson, K. F. Nolan, P. J. Fairchild and H. Waldmann (2006). "Immune privilege induced by regulatory T cells in transplantation tolerance." Immunol Rev **213**: 239-255.
- Cohen, M., O. Matcovitch, E. David, Z. Barnett-Itzhaki, H. Keren-Shaul, R. Blecher-Gonen, D. A. Jaitin, A. Sica, I. Amit and M. Schwartz (2014). "Chronic exposure to TGFbeta1 regulates myeloid cell inflammatory response in an IRF7-dependent manner." EMBO J **33**(24): 2906-2921.
- Constam, D. B., J. Philipp, U. V. Malipiero, P. ten Dijke, M. Schachner and A. Fontana (1992). "Differential expression of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 by glioblastoma cells, astrocytes, and microglia." J Immunol **148**(5): 1404-1410.
- Cresswell, P. (1994). "Assembly, transport, and function of MHC class II molecules." Annu Rev Immunol **12**: 259-293.
- Curotto de Lafaille, M. A. and J. J. Lafaille (2009). "Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?" Immunity **30**(5): 626-635.

Chow, J. C., D. W. Young, D. T. Golenbock, W. J. Christ and F. Gusovsky (1999). "Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction." *J Biol Chem* **274**(16): 10689-10692.

Date, I., S. Y. Felten and D. L. Felten (1991). "The nigrostriatal dopaminergic system in MPTP-treated mice shows more prominent recovery by syngeneic adrenal medullary graft than by allogeneic or xenogeneic graft." *Brain Res* **545**(1-2): 191-198.

David, S. and A. Kroner (2011). "Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury." *Nat Rev Neurosci* **12**(7): 388-399.

de Wit, H., D. W. Hendriks, M. R. Halie and E. Vellenga (1994). "Interleukin-4 receptor regulation in human monocytic cells." *Blood* **84**(2): 608-615.

Del Río-Hortega P, P. W. (1927). "Cerebral cicatrix. The reaction of neuroglia and microglia to brain wounds." *Bull Johns Hopkins Hosp* **41**: 5.

Del Río-Hortega , P. W. (1932). *Microglia. In: Cytology and cellular pathology of the nervous system*, New York: Hoeber.

Dello Russo, C., A. I. Boullerne, V. Gavriluk and D. L. Feinstein (2004). "Inhibition of microglial inflammatory responses by norepinephrine: effects on nitric oxide and interleukin-1beta production." *J Neuroinflammation* **1**(1): 9.

Deng, J., P. D. Lu, Y. Zhang, D. Scheuner, R. J. Kaufman, N. Sonenberg, H. P. Harding and D. Ron (2004). "Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2." *Mol Cell Biol* **24**(23): 10161-10168.

Deng, L., Y. Li, J. M. Huang, G. Zhou, W. Qian and K. Xu (2011). "Effects of p-CREB-1 on transforming growth factor-beta3 auto-regulation in hepatic stellate cells." *J Cell Biochem* **112**(4): 1046-1054.

Dent, P., Y. Fang, S. Gupta, E. Studer, C. Mitchell, S. Spiegel and P. B. Hylemon (2005). "Conjugated bile acids promote ERK1/2 and AKT activation via a pertussis toxin-sensitive mechanism in murine and human hepatocytes." *Hepatology* **42**(6): 1291-1299.

Derynck, R. and Y. E. Zhang (2003). "Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling." *Nature* **425**(6958): 577-584.

Diniz, L. P., V. Tortelli, M. N. Garcia, A. P. Araujo, H. M. Melo, G. S. Silva, F. G. Felice, S. V. Alves-Leon, J. M. Souza, L. F. Romao, N. G. Castro and F. C. Gomes (2014). "Astrocyte transforming growth factor beta 1 promotes inhibitory synapse formation via CaM kinase II signaling." *Glia* **62**(12): 1917-1931.

Dong Y, B. E. (2001). "Immune function of astrocytes. ." *Glia* **36**: 11.

- dos Santos, A. C., M. M. Barsante, R. M. Arantes, C. C. Bernard, M. M. Teixeira and J. Carvalho-Tavares (2005). "CCL2 and CCL5 mediate leukocyte adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis--an intravital microscopy study." *J Neuroimmunol* **162**(1-2): 122-129.
- Edwards, J. P., X. Zhang, K. A. Frauwirth and D. M. Mosser (2006). "Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations." *J Leukoc Biol* **80**(6): 1298-1307.
- Eggkin HM, S. M., Pols TWH (2014). "TGR5 ligands as potential therapeutics in inflammatory diseases." *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research* **6**: 9.
- El Kasmi, K. C., J. E. Qualls, J. T. Pesce, A. M. Smith, R. W. Thompson, M. Henao-Tamayo, R. J. Basaraba, T. König, U. Schleicher, M. S. Koo, G. Kaplan, K. A. Fitzgerald, E. I. Tuomanen, I. M. Orme, T. D. Kanneganti, C. Bogdan, T. A. Wynn and P. J. Murray (2008). "Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens." *Nat Immunol* **9**(12): 1399-1406.
- Elia, A. E., S. Lalli, M. R. Monsurro, A. Sagnelli, A. C. Taiello, B. Reggiori, V. La Bella, G. Tedeschi and A. Albanese (2015). "Tauroursodeoxycholic acid in the treatment of patients with amyotrophic lateral sclerosis." *Eur J Neurol*.
- Engelhardt, B. and R. M. Ransohoff (2005). "The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms." *Trends Immunol* **26**(9): 485-495.
- Farina, C., F. Aloisi and E. Meinl (2007). "Astrocytes are active players in cerebral innate immunity." *Trends Immunol* **28**(3): 138-145.
- Fenn, A. M., C. J. Henry, Y. Huang, A. Dugan and J. P. Godbout (2012). "Lipopolysaccharide-induced interleukin (IL)-4 receptor-alpha expression and corresponding sensitivity to the M2 promoting effects of IL-4 are impaired in microglia of aged mice." *Brain Behav Immun* **26**(5): 766-777.
- Flanders, K. C., R. F. Ren and C. F. Lippa (1998). "Transforming growth factor-betas in neurodegenerative disease." *Prog Neurobiol* **54**(1): 71-85.
- Fontenot, J. D., M. A. Gavin and A. Y. Rudensky (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." *Nat Immunol* **4**(4): 330-336.
- Frank-Cannon, T.C., L.T. Alto, F.E. McAlpine and M.G. Tansey (2009). "Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases?" *Mol Neurodegener* **4**: 47.
- Fukushima, T., R. Y. Liu and J. H. Byrne (2007). "Transforming growth factor-beta2 modulates synaptic efficacy and plasticity and induces phosphorylation of CREB in hippocampal neurons." *Hippocampus* **17**(1): 5-9.

- Gadani, S. P., J. C. Cronk, G. T. Norris and J. Kipnis (2012). "IL-4 in the brain: a cytokine to remember." J Immunol **189**(9): 4213-4219.
- Gavin, M. and A. Rudensky (2003). "Control of immune homeostasis by naturally arising regulatory CD4⁺ T cells." Curr Opin Immunol **15**(6): 690-696.
- Gensel, J. C. and B. Zhang (2015). "Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury." Brain Res.
- Ginhoux, F., M. Greter, M. Leboeuf, S. Nandi, P. See, S. Gokhan, M. F. Mehler, S. J. Conway, L. G. Ng, E. R. Stanley, I. M. Samokhvalov and M. Merad (2010). "Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages." Science **330**(6005): 841-845.
- Ginhoux, F., S. Lim, G. Hoeffel, D. Low and T. Huber (2013). "Origin and differentiation of microglia." Front Cell Neurosci **7**: 45.
- Gonzalez, H., D. Elgueta, A. Montoya and R. Pacheco (2014). "Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases." J Neuroimmunol **274**(1-2): 1-13.
- Gordon, S. (2003). "Alternative activation of macrophages." Nat Rev Immunol **3**(1): 23-35.
- Gray, M. J., M. Poljakovic, D. Kepka-Lenhart and S. M. Morris, Jr. (2005). "Induction of arginase I transcription by IL-4 requires a composite DNA response element for STAT6 and C/EBPbeta." Gene **353**(1): 98-106.
- Green, L. C., D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok and S. R. Tannenbaum (1982). "Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids." Anal Biochem **126**(1): 131-138.
- Gundersen, H. J., T. F. Bendtsen, L. Korbo, N. Marcussen, A. Moller, K. Nielsen, J. R. Nyengaard, B. Pakkenberg, F. B. Sorensen, A. Vesterby and et al. (1988). "Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis." APMIS **96**(5): 379-394.
- Gunning, P. W., G. E. Landreth, M. A. Bothwell and E. M. Shooter (1981). "Differential and synergistic actions of nerve growth factor and cyclic AMP in PC12 cells." J Cell Biol **89**(2): 240-245.
- Hanisch, U. K. and H. Kettenmann (2007). "Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain." Nat Neurosci **10**(11): 1387-1394.
- Hannila, S. S. and M. T. Filbin (2008). "The role of cyclic AMP signaling in promoting axonal regeneration after spinal cord injury." Exp Neurol **209**(2): 321-332.
- Hausmann, O. N. (2003). "Post-traumatic inflammation following spinal cord injury." Spinal Cord **41**(7): 369-378.

Hayden, M. S. and S. Ghosh (2008). "Shared principles in NF-kappaB signaling." Cell **132**(3): 344-362.

Hernangomez, M., F. J. Carrillo-Salinas, M. Mecha, F. Correa, L. Mestre, F. Loria, A. Feliu, F. Docagne and C. Guaza (2014). "Brain innate immunity in the regulation of neuroinflammation: therapeutic strategies by modulating CD200-CD200R interaction involve the cannabinoid system." Curr Pharm Des **20**(29): 4707-4722.

Hernangomez, M., L. Mestre, F. G. Correa, F. Loria, M. Mecha, P. M. Inigo, F. Docagne, R. O. Williams, J. Borrell and C. Guaza (2012). "CD200-CD200R1 interaction contributes to neuroprotective effects of anandamide on experimentally induced inflammation." Glia **60**(9): 1437-1450.

Hickey, W. F., B. L. Hsu and H. Kimura (1991). "T-lymphocyte entry into the central nervous system." J Neurosci Res **28**(2): 254-260.

Hinkerohe, D., D. Smikalla, A. Haghikia, K. Heupel, C. G. Haase, R. Dermietzel and P. M. Faustmann (2005). "Effects of cytokines on microglial phenotypes and astroglial coupling in an inflammatory coculture model." Glia **52**(2): 85-97.

Horbelt, D., A. Denkis and P. Knaus (2012). "A portrait of Transforming Growth Factor beta superfamily signalling: Background matters." Int J Biochem Cell Biol **44**(3): 469-474.

Hosokawa, R., K. Nonaka, M. Morifuji, L. Shum and M. Ohishi (2003). "TGF-beta 3 decreases type I collagen and scarring after labioplasty." J Dent Res **82**(7): 558-564.

Hua, F., T. Ha, J. Ma, Y. Li, J. Kelley, X. Gao, I. W. Browder, R. L. Kao, D. L. Williams and C. Li (2007). "Protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in TLR4-deficient mice is mediated through a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism." J Immunol **178**(11): 7317-7324.

Ichikawa R, T. T., Yoneno K, et al. (2012). "Bile acids induce monocyte differentiation toward interleukin-12 hypo-producing dendritic cells via a TGR5 dependent pathway." Immunology **136**(2): 10.

Jacobs, M. D. and S. C. Harrison (1998). "Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex." Cell **95**(6): 749-758.

Jakway, J. P., H. G. Morris, E. J. Blumenthal and D. W. Talmage (1980). "Serum factors required for arginase induction in macrophages." Cell Immunol **54**(2): 253-264.

John, G. R., S. C. Lee and C. F. Brosnan (2003). "Cytokines: powerful regulators of glial cell activation." Neuroscientist **9**(1): 10-22.

John, G. R., S. C. Lee, X. Song, M. Rivieccio and C. F. Brosnan (2005). "IL-1-regulated responses in astrocytes: relevance to injury and recovery." Glia **49**(2): 161-176.

- Joo, S. S., T. J. Won and D. I. Lee (2004). "Potential role of ursodeoxycholic acid in suppression of nuclear factor kappa B in microglial cell line (BV-2)." *Arch Pharm Res* **27**(9): 954-960.
- Kambayashi, T., R. P. Wallin and H. G. Ljunggren (2001). "cAMP-elevating agents suppress dendritic cell function." *J Leukoc Biol* **70**(6): 903-910.
- Kawamata Y, F. R., Hosoya M, et al (2003). "A G protein-coupled receptor responsive to bile acids." *J Biol Chem* **278**(11): 6.
- Keene, C. D., C. M. Rodrigues, T. Eich, M. S. Chhabra, C. J. Steer and W. C. Low (2002). "Tauroursodeoxycholic acid, a bile acid, is neuroprotective in a transgenic animal model of Huntington's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(16): 10671-10676.
- Keitel, V., M. Donner, S. Winandy, R. Kubitz and D. Haussinger (2008). "Expression and function of the bile acid receptor TGR5 in Kupffer cells." *Biochem Biophys Res Commun* **372**(1): 78-84.
- Keitel V, G. B., Bidmon HJ, et al. (2010). "The bile acid receptor TGR5 (Gpbar-1) acts as a neurosteroid receptor in brain." *Glia* **58**(15): 11.
- Kettenmann, H., U. K. Hanisch, M. Noda and A. Verkhratsky (2011). "Physiology of microglia." *Physiol Rev* **91**(2): 461-553.
- Kida T, T. Y., Hori M, Ozaki H, Murata T. (2013). "Bile acid receptor TGR5 agonism induces NO production and reduces monocyte adhesion in vascular endothelial cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**(7): 7.
- Kierdorf, K., D. Erny, T. Goldmann, V. Sander, C. Schulz, E. G. Perdiguero, P. Wieghofer, A. Heinrich, P. Riemke, C. Holscher, D. N. Muller, B. Luckow, T. Brocker, K. Debowski, G. Fritz, G. Opdenakker, A. Diefenbach, K. Biber, M. Heikenwalder, F. Geissmann, F. Rosenbauer and M. Prinz (2013). "Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways." *Nat Neurosci* **16**(3): 273-280.
- Kigerl, K. A., J. C. Gensel, D. P. Ankeny, J. K. Alexander, D. J. Donnelly and P. G. Popovich (2009). "Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord." *J Neurosci* **29**(43): 13435-13444.
- Kim, W. K., S. Y. Hwang, E. S. Oh, H. Z. Piao, K. W. Kim and I. O. Han (2004). "TGF-beta1 represses activation and resultant death of microglia via inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity." *J Immunol* **172**(11): 7015-7023.
- Kim, W. K., Y. Kan, D. Ganea, R. P. Hart, I. Gozes and G. M. Jonakait (2000). "Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide inhibit tumor necrosis factor-alpha production in injured spinal cord and in activated microglia via a cAMP-dependent pathway." *J Neurosci* **20**(10): 3622-3630.

- Kingsley-Kallesen, M., T. A. Luster and A. Rizzino (2001). "Transcriptional regulation of the transforming growth factor-beta2 gene in glioblastoma cells." In Vitro Cell Dev Biol Anim **37**(10): 684-690.
- Kipnis, J., H. Avidan, R. R. Caspi and M. Schwartz (2004). "Dual effect of CD4+CD25+ regulatory T cells in neurodegeneration: a dialogue with microglia." Proc Natl Acad Sci U S A **101 Suppl 2**: 14663-14669.
- Kobayashi, K., L. D. Hernandez, J. E. Galan, C. A. Janeway, Jr., R. Medzhitov and R. A. Flavell (2002). "IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling." Cell **110**(2): 191-202.
- Koning, N., L. Bo, R. M. Hoek and I. Huitinga (2007). "Downregulation of macrophage inhibitory molecules in multiple sclerosis lesions." Ann Neurol **62**(5): 504-514.
- Koning, N., M. van Eijk, W. Pouwels, M. S. Brouwer, D. Voehringer, I. Huitinga, R. M. Hoek, G. Raes and J. Hamann (2010). "Expression of the inhibitory CD200 receptor is associated with alternative macrophage activation." J Innate Immun **2**(2): 195-200.
- Kreutzberg, G. W. (1996). "Microglia: a sensor for pathological events in the CNS." Trends Neurosci **19**(8): 312-318.
- Kriegstein, K., M. Rufer, C. Suter-Crazzolara and K. Unsicker (1995). "Neural functions of the transforming growth factors beta." Int J Dev Neurosci **13**(3-4): 301-315.
- Lathe, R., A. Sapronova and Y. Kotelevtsev (2014). "Atherosclerosis and Alzheimer--diseases with a common cause? Inflammation, oxysterols, vasculature." BMC Geriatr **14**: 36.
- Le, D. T., B. H. Ladle, T. Lee, V. Weiss, X. Yao, A. Leubner, T. D. Armstrong and E. M. Jaffee (2011). "CD8(+) Foxp3(+) tumor infiltrating lymphocytes accumulate in the context of an effective anti-tumor response." Int J Cancer **129**(3): 636-647.
- Le, Y., P. Iribarren, W. Gong, Y. Cui, X. Zhang and J. M. Wang (2004). "TGF-beta1 disrupts endotoxin signaling in microglial cells through Smad3 and MAPK pathways." J Immunol **173**(2): 962-968.
- Leask, A. and D. J. Abraham (2004). "TGF-beta signaling and the fibrotic response." FASEB J **18**(7): 816-827.
- Lehnardt, S., C. Lachance, S. Patrizi, S. Lefebvre, P. L. Follett, F. E. Jensen, P. A. Rosenberg, J. J. Volpe and T. Vartanian (2002). "The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS." J Neurosci **22**(7): 2478-2486.
- Lehnardt, S., L. Massillon, P. Follett, F. E. Jensen, R. Ratan, P. A. Rosenberg, J. J. Volpe and T. Vartanian (2003). "Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8514-8519.

- Lenglet, T., L. Lacomblez, J. L. Abitbol, A. Ludolph, J. S. Mora, W. Robberecht, P. J. Shaw, R. M. Pruss, V. Cuvier, V. Meininger and g. Mitotarget study (2014). "A phase II-III trial of olesoxime in subjects with amyotrophic lateral sclerosis." *Eur J Neurol* **21**(3): 529-536.
- Letiembre, M., W. Hao, Y. Liu, S. Walter, I. Mihaljevic, S. Rivest, T. Hartmann and K. Fassbender (2007). "Innate immune receptor expression in normal brain aging." *Neuroscience* **146**(1): 248-254.
- Lewis, N. D., L. A. Patnaude, J. Pelletier, D. J. Souza, S. M. Lukas, F. J. King, J. D. Hill, D. E. Stefanopoulos, K. Ryan, S. Desai, D. Skow, S. G. Kauschke, A. Broermann, D. Kuzmich, C. Harcken, E. R. Hickey and L. K. Modis (2014). "A GPBAR1 (TGR5) small molecule agonist shows specific inhibitory effects on myeloid cell activation in vitro and reduces experimental autoimmune encephalitis (EAE) in vivo." *PLoS One* **9**(6): e100883.
- Lin, A. H., J. Luo, L. H. Mondschein, P. ten Dijke, D. Vivien, C. H. Contag and T. Wyss-Coray (2005). "Global analysis of Smad2/3-dependent TGF-beta signaling in living mice reveals prominent tissue-specific responses to injury." *J Immunol* **175**(1): 547-554.
- Lindholm, D., E. Castren, R. Kiefer, F. Zafra and H. Thoenen (1992). "Transforming growth factor-beta 1 in the rat brain: increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation." *J Cell Biol* **117**(2): 395-400.
- Lindor, K. D., E. R. Dickson, W. P. Baldus, R. A. Jorgensen, J. Ludwig, P. A. Murtaugh, J. M. Harrison, R. H. Wiesner, M. L. Anderson, S. M. Lange and et al. (1994). "Ursodeoxycholic acid in the treatment of primary biliary cirrhosis." *Gastroenterology* **106**(5): 1284-1290.
- Liu, G., W. Ding, J. Neiman and K. M. Mulder (2006). "Requirement of Smad3 and CREB-1 in mediating transforming growth factor-beta (TGF beta) induction of TGF beta 3 secretion." *J Biol Chem* **281**(40): 29479-29490.
- Liu, Y., I. Teige, B. Birnir and S. Issazadeh-Navikas (2006). "Neuron-mediated generation of regulatory T cells from encephalitogenic T cells suppresses EAE." *Nat Med* **12**(5): 518-525.
- Lowther, D. E. and D. A. Hafler (2012). "Regulatory T cells in the central nervous system." *Immunol Rev* **248**(1): 156-169.
- Lucas, S. M., N. J. Rothwell and R. M. Gibson (2006). "The role of inflammation in CNS injury and disease." *Br J Pharmacol* **147 Suppl 1**: S232-240.
- Luo, J., A. H. Lin, E. Masliah and T. Wyss-Coray (2006). "Bioluminescence imaging of Smad signaling in living mice shows correlation with excitotoxic neurodegeneration." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(48): 18326-18331.
- MacMicking, J., Q. W. Xie and C. Nathan (1997). "Nitric oxide and macrophage function." *Annu Rev Immunol* **15**: 323-350.

- Manrique, S. Z., M. A. Correa, D. B. Hoelzinger, A. L. Dominguez, N. Mirza, H. H. Lin, J. Stein-Streilein, S. Gordon and J. Lustgarten (2011). "Foxp3-positive macrophages display immunosuppressive properties and promote tumor growth." *J Exp Med* **208**(7): 1485-1499.
- Mantovani, A., A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi and M. Locati (2004). "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization." *Trends Immunol* **25**(12): 677-686.
- Markiewicz, I. and B. Lukomska (2006). "The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system." *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **66**(4): 343-358.
- Martinez, F. O., A. Sica, A. Mantovani and M. Locati (2008). "Macrophage activation and polarization." *Front Biosci* **13**: 453-461.
- Maruyama T, M. Y., nakamura T, et al. (2002). "Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR)." *Biochem Biophys Res Commun* **298**(5): 6.
- Matejuk, A., J. Dwyer, C. Hopke, A. A. Vandembark and H. Offner (2004). "Opposing roles for TGF-beta1 and TGF-beta3 isoforms in experimental autoimmune encephalomyelitis." *Cytokine* **25**(2): 45-51.
- Mattson, M. P. and S. Camandola (2001). "NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders." *J Clin Invest* **107**(3): 247-254.
- McCarthy, K. D. and J. de Vellis (1980). "Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue." *J Cell Biol* **85**(3): 890-902.
- Mecha M, M. L., Hernangómez M, Borrell J, Guaza C (2011). "An easy and fast way to obtain a high number of glial cells from rat cerebral tissue: a beginners approach." *Protocol Exchange* **218**.
- Mosser, D. M. (2003). "The many faces of macrophage activation." *J Leukoc Biol* **73**(2): 209-212.
- Mosser, D. M. and J. P. Edwards (2008). "Exploring the full spectrum of macrophage activation." *Nat Rev Immunol* **8**(12): 958-969.
- Munder, M., K. Eichmann, J. M. Moran, F. Centeno, G. Soler and M. Modolell (1999). "Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells." *J Immunol* **163**(7): 3771-3777.
- Murai, M., O. Turovskaya, G. Kim, R. Madan, C. L. Karp, H. Cheroutre and M. Kronenberg (2009). "Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis." *Nat Immunol* **10**(11): 1178-1184.

- Nakao, A., T. Imamura, S. Souchelnytskyi, M. Kawabata, A. Ishisaki, E. Oeda, K. Tamaki, J. Hanai, C. H. Heldin, K. Miyazono and P. ten Dijke (1997). "TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4." *EMBO J* **16**(17): 5353-5362.
- Nashar, T. O. and J. R. Drake (2006). "Dynamics of MHC class II-activating signals in murine resting B cells." *J Immunol* **176**(2): 827-838.
- Nathan, C. F., H. W. Murray, M. E. Wiebe and B. Y. Rubin (1983). "Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity." *J Exp Med* **158**(3): 670-689.
- Nelms, K., A. D. Keegan, J. Zamorano, J. J. Ryan and W. E. Paul (1999). "The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions." *Annu Rev Immunol* **17**: 701-738.
- Nelson, C. A. and D. H. Fremont (1999). "Structural principles of MHC class II antigen presentation." *Rev Immunogenet* **1**(1): 47-59.
- Neumann, S., F. Bradke, M. Tessier-Lavigne and A. I. Basbaum (2002). "Regeneration of sensory axons within the injured spinal cord induced by intraganglionic cAMP elevation." *Neuron* **34**(6): 885-893.
- Niehof, M., M. P. Manns and C. Trautwein (1997). "CREB controls LAP/C/EBP beta transcription." *Mol Cell Biol* **17**(7): 3600-3613.
- Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff and F. Helmchen (2005). "Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo." *Science* **308**(5726): 1314-1318.
- Nissl (1899). "Ueber einige Beziehungen zwishcen Nerven zellerkrankungen und gliosen Erscheinungen bei verschiedenen Psychosen." *Arch Psychiat* **32**: 21.
- Paxinos, K. (1997). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.*, San Diego: Academic Press.
- Perea, G., M. Navarrete and A. Araque (2009). "Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information." *Trends Neurosci* **32**(8): 421-431.
- Perry, V. H. and J. Teeling (2013). "Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration." *Semin Immunopathol* **35**(5): 601-612.
- Pitson, S. M., P. A. Moretti, J. R. Zebol, H. E. Lynn, P. Xia, M. A. Vadas and B. W. Wattenberg (2003). "Activation of sphingosine kinase 1 by ERK1/2-mediated phosphorylation." *EMBO J* **22**(20): 5491-5500.
- Polazzi, E., L. E. Altamira, S. Eleuteri, R. Barbaro, C. Casadio, A. Contestabile and B. Monti (2009). "Neuroprotection of microglial conditioned medium on 6-hydroxydopamine-induced neuronal death: role of transforming growth factor beta-2." *J Neurochem* **110**(2): 545-556.

Pols, T. (2014). "TGR5 in inflammation and cardiovascular disease." Biochem Soc Trans **42**(2): 6.

Popovich, P. G., Z. Guan, V. McGaughy, L. Fisher, W. F. Hickey and D. M. Basso (2002). "The neuropathological and behavioral consequences of intraspinal microglial/macrophage activation." J Neuropathol Exp Neurol **61**(7): 623-633.

Proud, C. G. (2007). "Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery." Biochem J **403**(2): 217-234.

Qian, L., S. J. Wei, D. Zhang, X. Hu, Z. Xu, B. Wilson, J. El-Benna, J. S. Hong and P. M. Flood (2008). "Potent anti-inflammatory and neuroprotective effects of TGF-beta1 are mediated through the inhibition of ERK and p47phox-Ser345 phosphorylation and translocation in microglia." J Immunol **181**(1): 660-668.

Ransohoff, R. M. and B. Engelhardt (2012). "The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system." Nat Rev Immunol **12**(9): 623-635.

Ransohoff, R. M. and V. H. Perry (2009). "Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses." Annu Rev Immunol **27**: 119-145.

Rodrigues, C. M., S. Sola, Z. Nan, R. E. Castro, P. S. Ribeiro, W. C. Low and C. J. Steer (2003). "Tauroursodeoxycholic acid reduces apoptosis and protects against neurological injury after acute hemorrhagic stroke in rats." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(10): 6087-6092.

Rodrigues, C. M., S. R. Spellman, S. Sola, A. W. Grande, C. Linehan-Stieers, W. C. Low and C. J. Steer (2002). "Neuroprotection by a bile acid in an acute stroke model in the rat." J Cereb Blood Flow Metab **22**(4): 463-471.

Rodrigues CM, S. S., Sola S, Grande AW, Linehan-Stieers C, Low WC, Steer CJ (2002). "Neuroprotection by a bile acid in an acute stroke model in the rat." J Cereb Blood Flow Metab **22**: 8.

Ruffell, D., F. Mourkioti, A. Gambardella, P. Kirstetter, R. G. Lopez, N. Rosenthal and C. Nerlov (2009). "A CREB-C/EBPbeta cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(41): 17475-17480.

Ryan, J. L., W. B. Yohe and D. C. Morrison (1980). "Stimulation of peritoneal cell arginase by bacterial lipopolysaccharides." Am J Pathol **99**(2): 451-462.

Saijo, K. and C. K. Glass (2011). "Microglial cell origin and phenotypes in health and disease." Nat Rev Immunol **11**(11): 775-787.

Sakaguchi, S., M. Miyara, C. M. Costantino and D. A. Hafler (2010). "FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system." Nat Rev Immunol **10**(7): 490-500.

- Saura, M., C. Zaragoza, M. Diaz-Cazorla, O. Hernandez-Perera, E. Eng, C. J. Lowenstein, D. Perez-Sala and S. Lamas (1998). "Involvement of transcriptional mechanisms in the inhibition of NOS2 expression by dexamethasone in rat mesangial cells." Kidney Int **53**(1): 38-49.
- Schaap, F. G., M. Trauner and P. L. Jansen (2014). "Bile acid receptors as targets for drug development." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **11**(1): 55-67.
- Schedel, M., R. Frei, C. Bieli, L. Cameron, J. Adamski, R. Lauener and M. Kabesch (2009). "An IgE-associated polymorphism in STAT6 alters NF-kappaB binding, STAT6 promoter activity, and mRNA expression." J Allergy Clin Immunol **124**(3): 583-589, 589 e581-586.
- Schroeter M, J. S. (2005). "T-cell cytokines in injury-induced neural damage and repair. ." Neuromolecular Med **7**: 12.
- Seki, E., S. De Minicis, C. H. Osterreicher, J. Kluwe, Y. Osawa, D. A. Brenner and R. F. Schwabe (2007). "TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis." Nat Med **13**(11): 1324-1332.
- Semple, B. D., T. Kossmann and M. C. Morganti-Kossmann (2010). "Role of chemokines in CNS health and pathology: a focus on the CCL2/CCR2 and CXCL8/CXCR2 networks." J Cereb Blood Flow Metab **30**(3): 459-473.
- Shah, S. and L. Qiao (2008). "Resting B cells expand a CD4+CD25+Foxp3+ Treg population via TGF-beta3." Eur J Immunol **38**(9): 2488-2498.
- Sheikh, M. S. and Y. Huang (2003). "Death receptor activation complexes: it takes two to activate TNF receptor 1." Cell Cycle **2**(6): 550-552.
- Sica, A. and A. Mantovani (2012). "Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas." J Clin Invest **122**(3): 787-795.
- Skaper, S. D., L. Facci and P. Giusti (2014). "Neuroinflammation, Microglia and Mast Cells in the Pathophysiology of Neurocognitive Disorders: A Review." CNS Neurol Disord Drug Targets.
- Skeen, M. J., M. A. Miller, T. M. Shinnick and H. K. Ziegler (1996). "Regulation of murine macrophage IL-12 production. Activation of macrophages in vivo, restimulation in vitro, and modulation by other cytokines." J Immunol **156**(3): 1196-1206.
- Sly, L. M., M. J. Rauh, J. Kalesnikoff, C. H. Song and G. Krystal (2004). "LPS-induced upregulation of SHIP is essential for endotoxin tolerance." Immunity **21**(2): 227-239.
- Sofroniew, M. V. and H. V. Vinters (2010). "Astrocytes: biology and pathology." Acta Neuropathol **119**(1): 7-35.

- Spomer L, G. C., Schmitz B, Häusinger D, Gohlke H, Keitel V. (2013). "A membrane-proximal, C-terminal α -helix is required for plasma membrane localization and function of the G Protein-coupled receptor (GPCR) TGR5." *J Biol Chem* **289**(6): 13.
- Standiford, T. J., R. Kuick, U. Bhan, J. Chen, M. Newstead and V. G. Keshamouni (2011). "TGF-beta-induced IRAK-M expression in tumor-associated macrophages regulates lung tumor growth." *Oncogene* **30**(21): 2475-2484.
- Stein, M., S. Keshav, N. Harris and S. Gordon (1992). "Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation." *J Exp Med* **176**(1): 287-292.
- Studer, E., X. Zhou, R. Zhao, Y. Wang, K. Takabe, M. Nagahashi, W. M. Pandak, P. Dent, S. Spiegel, R. Shi, W. Xu, X. Liu, P. Bohdan, L. Zhang, H. Zhou and P. B. Hylemon (2012). "Conjugated bile acids activate the sphingosine-1-phosphate receptor 2 in primary rodent hepatocytes." *Hepatology* **55**(1): 267-276.
- Szabo, S. J., J. S. Gold, T. L. Murphy and K. M. Murphy (1993). "Identification of cis-acting regulatory elements controlling interleukin-4 gene expression in T cells: roles for NF- κ B and NF-ATc." *Mol Cell Biol* **13**(8): 4793-4805.
- Tanga, F. Y., N. Natile-McMenemy and J. A. DeLeo (2005). "The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(16): 5856-5861.
- Taylor, P. R., L. Martinez-Pomares, M. Stacey, H. H. Lin, G. D. Brown and S. Gordon (2005). "Macrophage receptors and immune recognition." *Annu Rev Immunol* **23**: 901-944.
- Thornton, A. M. and E. M. Shevach (1998). "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production." *J Exp Med* **188**(2): 287-296.
- Ting, J. P. and J. Trowsdale (2002). "Genetic control of MHC class II expression." *Cell* **109 Suppl**: S21-33.
- Trajkovic, V., O. Vuckovic, S. Stosic-Grujicic, D. Miljkovic, D. Popadic, M. Markovic, V. Bumbasirevic, A. Backovic, I. Cvetkovic, L. Harhaji, Z. Ramic and M. Mostarica Stojkovic (2004). "Astrocyte-induced regulatory T cells mitigate CNS autoimmunity." *Glia* **47**(2): 168-179.
- Tran, E. H., E. N. Prince and T. Owens (2000). "IFN-gamma shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines." *J Immunol* **164**(5): 2759-2768.
- Traugott, U. and P. Lebon (1988). "Multiple sclerosis: involvement of interferons in lesion pathogenesis." *Ann Neurol* **24**(2): 243-251.

- van 't Veer, C., P. S. van den Pangaart, M. A. van Zoelen, M. de Kruif, R. S. Birjmohun, E. S. Stroes, A. F. de Vos and T. van der Poll (2007). "Induction of IRAK-M is associated with lipopolysaccharide tolerance in a human endotoxemia model." *J Immunol* **179**(10): 7110-7120.
- van Rossum, D. and U. K. Hanisch (2004). "Microglia." *Metab Brain Dis* **19**(3-4): 393-411.
- Varin, A. and S. Gordon (2009). "Alternative activation of macrophages: immune function and cellular biology." *Immunobiology* **214**(7): 630-641.
- Vignali, D. A., L. W. Collison and C. J. Workman (2008). "How regulatory T cells work." *Nat Rev Immunol* **8**(7): 523-532.
- Walker, D. G., J. E. Dalsing-Hernandez, N. A. Campbell and L. F. Lue (2009). "Decreased expression of CD200 and CD200 receptor in Alzheimer's disease: a potential mechanism leading to chronic inflammation." *Exp Neurol* **215**(1): 5-19.
- Walsh, J. T. and J. Kipnis (2011). "Regulatory T cells in CNS injury: the simple, the complex and the confused." *Trends Mol Med* **17**(10): 541-547.
- Walter, S., M. Letiembre, Y. Liu, H. Heine, B. Penke, W. Hao, B. Bode, N. Manietta, J. Walter, W. Schulz-Schuffer and K. Fassbender (2007). "Role of the toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease." *Cell Physiol Biochem* **20**(6): 947-956.
- Wang, X. J., S. Zhang, Z. Q. Yan, Y. X. Zhao, H. Y. Zhou, Y. Wang, G. Q. Lu and J. D. Zhang (2011). "Impaired CD200-CD200R-mediated microglia silencing enhances midbrain dopaminergic neurodegeneration: roles of aging, superoxide, NADPH oxidase, and p38 MAPK." *Free Radic Biol Med* **50**(9): 1094-1106.
- Wang, Y. D., W. D. Chen, D. Yu, B. M. Forman and W. Huang (2011). "The G-protein-coupled bile acid receptor, Gpbar1 (TGR5), negatively regulates hepatic inflammatory response through antagonizing nuclear factor kappa light-chain enhancer of activated B cells (NF-kappaB) in mice." *Hepatology* **54**(4): 1421-1432.
- Weiss, N., F. Miller, S. Cazaubon and P. O. Couraud (2009). "The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases." *Biochim Biophys Acta* **1788**(4): 842-857.
- Wen, A. Y., K. M. Sakamoto and L. S. Miller (2010). "The role of the transcription factor CREB in immune function." *J Immunol* **185**(11): 6413-6419.
- Won, J. S., Y. B. Im, A. K. Singh and I. Singh (2004). "Dual role of cAMP in iNOS expression in glial cells and macrophages is mediated by differential regulation of p38-MAPK/ATF-2 activation and iNOS stability." *Free Radic Biol Med* **37**(11): 1834-1844.
- Wrana, J. L., L. Attisano, R. Wieser, F. Ventura and J. Massague (1994). "Mechanism of activation of the TGF-beta receptor." *Nature* **370**(6488): 341-347.

- Xia, C., J. K. Cheshire, H. Patel and P. Woo (1997). "Cross-talk between transcription factors NF-kappa B and C/EBP in the transcriptional regulation of genes." Int J Biochem Cell Biol **29**(12): 1525-1539.
- Yanguas-Casás, N., M. A. Barreda-Manso, M. Nieto-Sampedro and L. Romero-Ramirez (2014). "Tauroursodeoxycholic acid reduces glial cell activation in an animal model of acute neuroinflammation." J Neuroinflammation **11**: 50.
- Yin, J. X., J. L. Tu, H. J. Lin, F. D. Shi, R. L. Liu, C. B. Zhao, S. W. Coons, S. Kuniyoshi and J. Shi (2010). "Centrally administered pertussis toxin inhibits microglia migration to the spinal cord and prevents dissemination of disease in an EAE mouse model." PLoS One **5**(8): e12400.
- Yoneno K, B. J., Wammers M, et al. (2013). "TGR5 signalling inhibits the production of pro-inflammatory cytokines by in vitro differentiated inflammatory and intestinal macrophages in Crohn's disease." Immunology **139**(1): 11.
- Zhang, K. and R. J. Kaufman (2008). "From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response." Nature **454**(7203): 455-462.
- Zhao, X., J. Dai, X. Xiao, L. Wu, J. Zeng, J. Sheng, J. Su, X. Chen, G. Wang and K. Li (2014). "PI3K/Akt signaling pathway modulates influenza virus induced mouse alveolar macrophage polarization to M1/M2b." PLoS One **9**(8): e104506.
- Zhou, A., S. Scoggin, R. B. Gaynor and N. S. Williams (2003). "Identification of NF-kappa B-regulated genes induced by TNFalpha utilizing expression profiling and RNA interference." Oncogene **22**(13): 2054-2064.
- Zhou, G. Y., J. M. Huang, L. Deng, K. H. Liu, Q. Li, W. Qian and K. S. Xu (2012). "[Effects of cAMP-response element binding protein-1 (CREB-1) on transforming growth factor-b3 (TGfb3) mRNA expression and promoter activity in hepatic stellate cells]." Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi **20**(11): 822-827.
- Zhou, X., B. Spittau and K. Kriegstein (2012). "TGfbeta signalling plays an important role in IL4-induced alternative activation of microglia." J Neuroinflammation **9**: 210.
- Ziegler-Heitbrock, H. W., A. Wedel, W. Schraut, M. Strobel, P. Wendelgass, T. Sternsdorf, P. A. Bauerle, J. G. Haas and G. Riethmuller (1994). "Tolerance to lipopolysaccharide involves mobilization of nuclear factor kappa B with predominance of p50 homodimers." J Biol Chem **269**(25): 17001-17004.



Anexo 1

Artículo original: Tauroursodeoxycholic acid reduces glial cell activation in an animal model of neuroinflammation. Publicado en Journal of Neuroinflammation.

Anexo 2

Otras aportaciones científicas de la doctoranda

Listado de publicaciones durante el periodo de doctorado que no forman parte de esta tesis doctoral

M. Asunción Barreda-Manso, **Natalia Yanguas-Casás**, Manuel Nieto-Sampedro, Lorenzo Romero-Ramírez. *Salubrinal inhibits the expression of proteoglycans and favors neurite outgrowth from cortical neurons in vitro*. Experimental Cell Research (2015).

L. Romero-Ramírez, M. A. Barreda-Manso, E. Dámaso-Riquelme, **N. Yanguas-Casás**, M. Nieto-Sampedro. *Modulación farmacológica de la cicatriz glial para la reparación de lesiones del SNC*. Trauma Fund MAPFRE (2014).

I. García-Álvarez, H. Groult, J. Casas, M. A. Barreda-Manso, **N. Yanguas-Casás**, M. Nieto-Sampedro, L. Romero-Ramírez, A. Fernández-Mayoralas. *Synthesis of antimetabolic thioglycosides: in vitro and in vivo evaluation of their anticancer activity*. Journal of Medicinal Chemistry (2011).

L. Bardaji, M. Añorga, R. W. Jackson, A. Martínez-Bilbao, **N. Yanguas-Casás**, J. Murillo. *Miniature Transposable Sequences Are Frequently Mobilized in the Bacterial Plant Pathogen Pseudomonas syringae pv. phaseolicola*. PLoS ONE (2011).

Aportaciones como primera autora en congresos Nacionales e Internacionales

- 1- Póster: *TUDCA skews microglia towards M2 phenotype through the G-protein coupled bile acid receptor GPBAR1/TGR5*. **Natalia Yanguas Casás**, Maria Asunción de la Barreda Manso, Manuel Nieto Sampedro, Lorenzo Romero Ramírez. XII European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, Bilbao, España (2015).
- 2- Póster: *TUDCA switches activated microglia to M2 phenotype in an animal model of acute neuroinflammation*. **Natalia Yanguas Casás**, Maria Asunción de la Barreda Manso, Manuel Nieto Sampedro, Lorenzo Romero Ramírez. 9th FENS Forum of Neuroscience, Milán, Italia (2014).
- 3- Comunicación oral: *Neuroinflammation: regulation by biliary salts*. **Natalia Yanguas Casás**. Jornadas Junior Cajal, Madrid, España (2014)
- 4- Póster: *TUDCA reduces microglial migratory capability both in vitro and in vivo*. **Natalia Yanguas Casás**, Maria Asunción de la Barreda Manso, Manuel Nieto Sampedro, Lorenzo Romero Ramírez. Neuroscience 2013, Society for Neuroscience, San Diego, EE.UU. (2013).
- 5- Póster: *TUDCA diminishes LPS induced microglial activation in mice hippocampus*. **Natalia Yanguas Casás**, Maria Asunción de la Barreda Manso, Manuel Nieto Sampedro, Lorenzo Romero Ramírez. 8th FENS Forum of Neuroscience, Barcelona, España (2012).